

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA E EVOLUÇÃO

VINÍCIUS TAIOQUI PELÁ

**ESTRATÉGIAS PARA O DESENVOLVIMENTO DE PRODUTOS
CONTRA O DESGASTE DENTÁRIO EROSIVO POR MEIO DA
ENGENHARIA DE PELÍCULA ADQUIRIDA COM CANECPI-5:
TRANSLAÇÃO DAS CIÊNCIAS BÁSICAS PARA A CLÍNICA**

SÃO CARLOS - SP

2022

VINÍCIUS TAIÓQUI PELÁ

**ESTRATÉGIAS PARA O DESENVOLVIMENTO DE PRODUTOS CONTRA O
DESGASTE DENTÁRIO EROSIVO POR MEIO DA ENGENHARIA DE PELÍCULA
ADQUIRIDA COM CANECPI-5: TRANSLAÇÃO DAS CIÊNCIAS BÁSICAS PARA A
CLÍNICA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular da Universidade Federal de São Carlos, para obtenção do título de Doutor em Ciências, área de concentração: Bioquímica e Biologia Molecular

Orientadora: Profa. Dra. Marília Afonso Rabelo Buzalaf

São Carlos - SP

2022



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular

Folha de Aprovação

Defesa de Tese de Doutorado do candidato Vinícius Taioqui Pelá, realizada em 30/09/2022.

Comissão Julgadora:

Profa. Dra. Marília Afonso Rabelo Buzalaf (USP)

Profa. Dra. Anuradha Prakki (U of T)

Profa. Dra. Tais Scaramucci Forlin (USP)

Profa. Dra. Melissa Thiemi Kato (FACOP)

Profa. Dra. Daniela Rios Honório (USP)

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular.

*Por onde eu ando sinto tua presença. Em todos os lugares está sempre perto de mim.
Em minhas escolhas vens me iluminar. Como posso te deixar se mesmo quando eu erro vens
me amar? E me ajuda a acertar; na tua direção, caminhar.
Como seria a minha vida se as tuas mãos não estivessem sobre mim?
Como seriam os meus sonhos se o teu espírito não habitasse em mim?
O teu amor me envolve. O teu amor me protege. És o meu porto seguro.
O melhor lugar de estar é no teu coração.
Sagrado coração!*

(Compositor: Samuel Ferreira)

*Dedico esta tese de doutorado a **Deus** e aos meus pais, **Adailton Pelá** e **Maria Vanderléia Taioqui Pelá**, os quais me permitiram o maravilhoso dom da vida, bem como uma família fundamentada na união, no respeito ao próximo, no amor e, sobretudo, na fé.*

AGRADECIMENTOS

A Deus

Ele é maior que tudo que possa existir em minha vida. Ele é meu reino, a minha fortaleza e o meu refúgio. Eu inicio os meus agradecimentos a Deus com estas palavras e com o coração repleto de fé, de amor e de gratidão. Primeiramente, a fé foi o que me trouxe até aqui, foi a luz para me conduzir nos momentos sombrios e a maneira mais sublime de estar próximo a Deus. Neste contexto, eu recordo a sábia parábola do vento e o mar, na qual Jesus questiona: “*mas ainda não tendes fé?*”(Mc 4, 35-41). Certamente, o segredo para essa pergunta foi se entregar na fé sem medo, sem desespero e sem rebeldia. É por esse caminho que hoje nós cremos, mas um dia contemplaremos.

O amor recebido por Deus também foi a inspiração para concluir esta etapa. Um Pai que nos ama, que nos acolhe e que nos atende. Antes mesmo que as minhas preces brotassem em meus lábios, Ele já ouvia o meu coração. Esse, de fato, é o real amor de Deus por nós, que privilégio ter conhecido o amor de Deus e o amar generosamente.

Uma poesia do século XVI retrata bem essa ideia: “*ainda que não houvesse céu, eu te amaria*” (Santa Teresa de Ávila). E, claro, nada melhor do que pensar que o amor de Deus não se limita a esta vida, pois existe um Céu maravilhoso esperando por nós, repleto de um amor ainda não vivenciado. É impossível falar de amor e não recordar de Nossa Senhora, Ela recebeu a maior de todas as divindades para amar e gerar o seu filho Jesus (*kekaritomene*, em grego, cheia de graça). É com essa graça que Nossa Senhora me ajudou, intercedendo a Deus por meus pedidos, sobretudo àqueles relacionados ao meu doutorado. Obrigado Nossa Senhora das Graças e Nossa Senhora de Aparecida por me acolher em seu coração divino, mesmo entregando as fragilidades de meu coração humano.

Hoje, a minha gratidão por Deus brota e transborda o meu coração. Obrigado por ser generoso e misericordioso. Destaco, neste momento, uma das mais lindas passagens: “*O Senhor é a minha força e o meu escudo; nele o meu coração confia, e dele recebo ajuda. Meu coração exulta de alegria, e com o meu cântico lhe darei graças*” (Salmo 28:7). Por fim, quero destacar o meu profundo agradecimento ao permitir que a minha luz sobrenatural da fé esteja unida com a minha luz natural da razão. Esta última luz eu estudei; a primeira, eu experimentei. Hoje, em conjunto, essas luzes formaram as asas que me permitiram voar e realizar este sonho! Muito obrigado, Deus!

À minha mãe Maria Vanderléia Taioqui Pelá e ao meu pai Adailton Pelá

Meus queridos pais, como é bom amar e ser amado. Eu não poderia deixar de usar a palavra amor para me referir a vocês logo no início. Certamente, esse sentimento ligado a fé representa a nossa centralidade, a qual também está em constante transformação. A história teve início há anos, antes que eu chegasse ao mundo. Nessa época, as dificuldades prevaleciam até mesmo sobre a esperança, eu não estava lá, mas acredito que a união e a determinação também foram os segredos para contornar os entraves da vida. O tempo passou e, com as novas primaveras, nasceram os filhos, despertando mais alegria e afeto. Estes sentimentos, somado aos demais já existentes, fortaleceram o nosso lar.

Atualmente, eu vejo que a transformação citada no início do texto ocorreu por meio da chegada de cada sentimento, e não pela mudança deles. Aliás, vocês são provas de que os sentimentos não mudam, muito menos desaparecem, quando eles se encontram enraizados no coração. E o que poderia resultar de tudo isso? A resposta é uma única palavra: Família. De forma singela, pequena, porém com um fardo incalculável de sentimentos que foram somados no decorrer da vida, os quais jamais desvanecem. A meu ver, essa é uma das poucas palavras que tem o poder de avivar as emoções. Não se esqueçam de que Deus um dia sonhou com a nossa família, antes mesmo de os contemplarem com a vida. E vocês, claro, vieram ao mundo com um propósito, idealizar o sonho Dele. Que privilégio ver que vocês construíram um pequeno Céu aqui na Terra, onde a fé, a esperança e o amor das antigas profecias, reinam, hoje, de forma inviolável. Pai e mãe, muito obrigado por me dar o dom da vida e me presentear com a nossa linda família. Em especial, eu agradeço por vocês permanecerem próximos do meu doutorado, oferecendo constantemente amor, apoio e preocupação com minha jornada. Hoje, eu dedico esta tese a vocês, os que transbordam meu coração de bons sentimentos e gratidão. Eu amo vocês!

Ao meu irmão, à minha cunhada e ao meu sobrinho

Meu irmão Adailton Pelá Junior, desde o meu nascimento você esteve presente em todos os momentos de minha vida. Com você, eu aprendi a viver, partindo da educação à religião. Você sempre foi um dos pilares de nossa casa, eu sempre te vejo como um exemplo de ser humano. Pois bem, eu nunca estive errado sobre essa opinião. Você só nos oferece orgulho, diante de todo o seu esforço com a nossa família. Assim, hoje eu transformo em palavras a

minha gratidão e admiração por você ser um grande irmão. Além disso, eu guardo todos os momentos saudosos que passamos juntos. As mais antigas, são as memórias de nossa infância, as quais foram repletas de alegria, carinho, respeito e união. O que me deixa mais feliz, é ver que tudo isso continua intacto até os dias de hoje. Muito obrigado.

A nossa família cresceu com mais duas pessoas especiais, Maria Thereza Mattos Pelá e Bernardo Mattos Pelá. Vocês chegaram para mostrar que ao invés de o amor se dividir, ele foi capaz de se multiplicar. Hoje, somos uma só família, vivendo as mesmas alegrias, sonhando os mesmos objetivos e chorando as mesmas tristezas. Eu não consigo ver um caminho diferente deste que nós mesmos delineamos. Cada um, com seu jeito único, se convergem para um só sentimento: o amor. Maria Tereza, muito obrigado por ser atenciosa, prestativa e, principalmente, por nos presentear com a riqueza de nossa família, o Bernardo. Ele, que tanto me encanta com o seu sorriso e afeto. Eu sou infinitamente feliz por desempenhar uma dupla função para o meu amado sobrinho/afilhado. Obrigado por esta confiança eterna. Jú, Má e Bernardo, eu amo vocês!

Aos meus estimados afilhados

Bernardo Pelá, Henrico Pelá e Lucas Taioqui. Vocês preenchem o meu coração com alegria, carinho e amor. Eu admiro o predomínio da pureza de vocês, onde a imaginação extrapola qualquer triste realidade. Vocês me ensinam a ter uma perspectiva de vida diferente, seguindo um olhar muito mais lúdico e colorido! Esta tese também foi feita especialmente para vocês, os futuros de nossa nação. Lembrem-se de que o Padrinho ama igualmente cada um de vocês. Meus eternos bebês, obrigado por transformarem a minha vida para melhor.

À Aparecida Pella Monteiro (*in memoriam*)

Minha querida Madrinha Cidinha, está chegando o momento de mais uma etapa concluída. Em todas as minhas formaturas, a Senhora sempre esteve presente na plateia, aplaudindo em pé. Infelizmente, esse brilho tão especial foi ofuscado nos últimos momentos importantes de minha vida, devido a sua ausência física. Entretanto, o que me conforta é que a Senhora está bem mais próxima do que eu imagino. Essa certeza surge por meio da presença espiritual e do poder que a Senhora tem de transmitir os meus pedidos a Deus. Nós continuamos

a nossa jornada por aqui, vivendo no mundo das Criaturas; enquanto a Senhora vive no mundo do Criador, pois não há um lugar melhor que esse. Obrigado por tudo o que a Senhora fez na Terra e faz no Céu.

À família Taioqui e Pelá

Com emoção eu agradeço a base da nossa família, os meus avós maternos: Maria José Taioqui (*in memoriam*) e Ângelo Taioqui (*in memoriam*). E os meus avós paternos: Alzira Semini Pelá (*in memoriam*) e Cezarino Pelá (*in memoriam*). Vocês preencheram o meu coração com tantos ensinamentos e boas memórias. Espero que vocês estejam aí no Céu recebendo toda a minha gratidão. Porque aqui embaixo, eu recebo bênçãos vindas de vocês. Para hoje, só me resta o amor e a saudade. Vocês deixaram um legado por meio dos filhos que vieram (meus tios e tias) e, conseqüentemente, seus netos (meus primos e primas).

Obrigado a todos da família Taioqui e Pelá, por estarem apoiando, rezando e torcendo para a conclusão deste doutorado. Que nossa união perdure a vida toda. Quero destacar algumas pessoas que fazem a diferença em minha vida por meio do amor *philia*: tia Vilma Taioqui, Pedro Taioqui, tia Sônia Silvério, Lays Mariana (minha afilhada da investidura de acólito), tia Derly Pelá, tio Nilton Pelá, Madrinha Iolanda Pelá, Padrinho Sidney Correia, Sileide Corrêia e tio Ângelo Pelá. Também agradeço aos meus queridos casais de primos: Viviane Taioqui e José Eduardo de Pieri; Mileni Pelá e Márcio Moraes. Vocês me presentearam com os meus preciosos afilhados, Lucas e Henrico, respectivamente. Todos vocês moram no meu coração.

À Aline Silva Braga

Eu esperei chegar este dia para tentar expressar em palavras a minha gratidão e o reconhecimento de nossa amizade. Você esteve ao meu lado desde o início, impulsionando os meus sonhos e, ao mesmo tempo, tornando-os concretos e inesquecíveis, principalmente por me oferecer segurança nos momentos de hesitação. Você sabe que, em todos os momentos da minha vida, houve a sua influência positiva. Hoje, o que mais me deixa emocionado é lembrar que as suas atitudes não foram apenas pela via profissional. Muito pelo contrário, foi pelo sentido da amizade. Por esse airoso caminho, eu tenho certeza que a nossa história não encontrará barreiras, tão pouco chegará ao fim. Pois, já estamos entrelaçados por razões

profundas, tais como, sentimentos, respeito e união. Eu a admiro intensamente e também me encanto com o seu jeito solidário, além de calma, bonita, inteligente e simpática. O que mais eu poderia exigir de você? Nada, isso já é o suficiente, em confirmação, eu posso ressaltar os nossos oito anos de amizade, que por sinal foram vividos intensamente. Este é apenas um parágrafo para descrever a nossa amizade. A continuação está toda descrita em minha memória e no meu coração! Obrigado por tudo o que você faz por mim!

À Talita Mendes Oliveira Ventura

O primeiro pensamento para descrever este agradecimento foi apontado para o outro lado do oceano, a Suíça. Neste país nós vivemos uma história encantadora, em que tudo parecia um sonho. Juntos, desbravamos montanhas, indo além de nossos medos. Hoje, eu acredito que essa coragem é devido ao nosso vínculo de amizade, o qual sempre foi intenso e próspero. Por falar em bravuras, foi com você e diante do início de uma pandemia que eu passei uma das maiores dúvidas e inseguranças de minha vida. Eu me recordo perfeitamente de nossos olhos lacrimosos frente à decisão de permanecer em Berna. A meu ver, a conclusão para essa escolha foi Deus e você, ambos me renderam forças para seguir a jornada. Como visto, as memórias são infinitas, são extraordinárias e únicas. Para qualquer lugar, elas iniciam na decolagem e finalizam no pouso de volta. Minha amiga Talita, muito obrigado por me ajudar profissionalmente e pessoalmente. Nesta tese, assim como na minha vida, eu encontro a sua valiosa contribuição.

À Even Akemi Taira

Nosso primeiro contato iniciou na graduação, porém a amizade foi fortalecida no mestrado. Os anos se passaram e hoje eu vejo que a nossa história se encontra lapidada de forma valiosa, ou seja, a sua amizade é uma joia preciosa em minha vida! Com você eu tenho momentos alegres e divertidos, os quais, na maioria das vezes, são festivos. Por outro lado, quando você veste o jaleco, uma profissional capacitada se faz presente. Enfim, obrigado por me ajudar diretamente no desenvolvimento desta tese. Você é especial, em qualquer ambiente, minha querida amiga Even.

Aos amigos: Ana Lúgia, Adriano Pessoa, Juliana Kniss, Natália Mello e Natara Dias

Vocês chegaram em minha vida de forma simples, cada qual em seu tempo, com suas características. Essas diferenças fundiram-se fortemente por meio do vínculo da amizade. Devido a isso, com vocês eu venho colecionando vários momentos marcantes. Na maioria das vezes, eles são repletos de cor, cheiro e sabor. Obrigado por essas memórias e, principalmente, quando o desânimo foi substituído por risadas e/ou quando trabalho árduo foi atenuado por um gesto. Assim, desejo profundamente que esta amizade continue sendo escrita de forma harmônica e repleta de união.

Às amigas fortificadas ao longo de minha vida

Meus queridos amigos, vocês são um tesouro em minha vida; uma benção enviada por Deus; uma felicidade constante e sem fim. Com esse sentimento, eu agradeço a todos que entraram em minha vida. Muito obrigado aos amigos do laboratório de bioquímica: Flávia Levy, Aline Dionízio, Mariana Sanches, Tatiana Martini, Mariele Vertuan, Vanessa Fakhoury e Aline Leite. Também a minha gratidão se volta aos meus amigos da época do ensino médio: Lays Faria, Kalebe Gabriel, Letícia Ferreira, Letícia Garcia, Agatha Lamas, Flávia Cantizani e Mariana Mantovani. Além disso, aproveito para agradecer aos amigos do Santuário do Sagrado Coração de Jesus: Bispo Emérito Don Caetano Ferrari, Padre Rodrigo Pereira, Diácono Rafael Mazzoni e André Shinohara. Ademais, agradeço aos amigos da época da graduação (USC): Rosa Cristina, Pedro Carlos, Juliane Buzzon, Heloise Morsoletto e Geraldo Júnior. Por fim, mas não menos importante eu agradeço as minhas amigas Taísa Império e Larissa Carvalho, bem como os meus amigos da Suíça: Erik Bernardineili e Rosmary Bannwart. Todos vocês são a prova de que ainda existem amizades incondicionais que merecem a eterna lealdade.

Ao Prof. Dr. Flávio Henrique Silva

Querido Professor, muito obrigado pelo desenvolvimento e fornecimento da cistatina derivada da cana-de-açúcar, a qual se tornou o foco central desta tese, ou seja, sem o senhor, nada disso seria possível. Nossa parceria teve início em 2015, quando nós iniciamos os primeiros estudos com essa proteína. Logo, obtivemos excelentes resultados. Isso nos levou a

escrever o meu projeto de doutorado. Hoje, com o sucesso deste tratamento inovador, totalizaram-se cinco estudos. Prof. Flávio, muito obrigado por ser atencioso, educado e humilde. É evidente que todas as nossas publicações se convergem para o reconhecimento do seu trabalho, o qual é feito com total excelência. Também agradeço por me atender (juntamente com o seu grupo de pesquisa) nos momentos de ineditismo do projeto, bem como na alta demanda de proteína necessária para cada estudo. Para o futuro, eu desejo que o nosso trabalho em conjunto se estenda por muitos anos e que possa continuar rendendo boas conquistas. Muito obrigado por ser um exemplo de professor e de cientista!

Ao Prof. Dr. Thiago Saads Carvalho

Parece que foi ontem quando nos encontramos por vídeo conferência para o delineamento da minha permanência na Suíça. Naquela época, eu já pressentia o início de uma grande jornada, mas hoje eu posso afirmar que foi muito maior do que eu esperava. Eu cheguei em Berna no dia mais desafiador da minha vida, por ter deixado tantas pessoas amadas no Brasil, porém as malas estavam cheias de sonhos e expectativas. Nesse momento, percebi que um novo capítulo estava pronto para ser escrito. Seria uma hipocrisia dizer que este caminho foi fácil e exclusivamente retilíneo. Aliás, nesse percurso, eu me deparei com um grande pesadelo: uma pandemia. Porém, este momento assustador foi amenizado e resolvido com a sua atenção e discernimento. Além disso, você sempre esteve disposto a compartilhar comigo inúmeros conhecimentos científicos. Eu fico muito honrado e agradecido por passar esse momento ao seu lado e ter feito parte de um grupo de pesquisa tão renomado. O tempo voou e dentro daquelas malas que eu havia levado, agora elas voltaram pesadas com a missão cumprida. Eu trouxe da Suíça os melhores sentimentos e várias lembranças, tais como, sorrisos, brincadeiras, conselhos e admiração. Enfim, essa incrível história estará para sempre registrada em minha vida. Por isso, devo ofertar os meus profundos e sinceros agradecimentos a você, que foi um alicerce para a realização deste sonho.

Ao Prof. Dr. Adrian Lussi

Desde quando eu iniciei a área acadêmica, os seus artigos e livros permanecem sobre minha mesa, ou seja, eu tenho uma profunda admiração e respeito por cada palavra que o senhor escreve nesses estudos. Um dos momentos mais sublimes da minha vida, foi ter o senhor como

orientador formal de minha permanência na Suíça. Muito obrigado por esta incrível oportunidade, por contribuir diretamente em cinco capítulos desta tese e por ser uma grande referência em nossa área de atuação. Eu tenho certeza que a comunidade científica mundial o agradece e o reconhece por tantas descobertas importantes, no que diz respeito à saúde bucal.

Ao laboratório da Universidade de Berna

Brigitte Megert, Hendrik Meyer Lueckel, Michael Stiebritz, Barbara Beyeler, Tommy Baumann, Samuel Furrer, Isabel Hug, Monika Aeberhard, Samira Niemeyer. Eu me lembro do primeiro contato com cada um de vocês. Confesso que minha timidez e a minha insegurança preponderavam o meu ser. Pois era tudo tão novo, tão diferente! Aos poucos eu fui me soltando e estar com vocês já era um sentimento de alegria por nossa boa convivência. Constantemente, eu refletia sobre as nossas diferenças, tais como, cultura, estilo, idioma. Era tudo tão oposto, mas um oposto especial e prazeroso! Um clássico exemplo, era ver que vocês sabiam que os meus melhores dias eram aqueles de muita neve; contrariamente para vocês. Obrigado por me acolherem na cultura local e por me ajudarem perenemente em meus projetos de pesquisa. Os meus ouvidos jamais esqueceram as palavras “sallu, guten morgen, tschüss” na voz de cada um de vocês. Para hoje, resta apenas uma saudade do tamanho da Jungfrauoch.

Aos Professores e técnicas do Laboratório de Bioquímica

Obrigado Prof. Dr. Rodrigo Cardoso de Oliveira e Profa. Dra. Ana Carolina Magalhães por se preocuparem com a qualidade da formação dos alunos e do laboratório de Bioquímica. A dedicação e o conhecimento de vocês nos impulsionam para a carreira acadêmica, ou seja, nós os reconhecemos como exemplo de profissionais. Sou muito grato pela atenção que vocês me proporcionaram durante as pesquisas. Por esses e inúmeros outros motivos, eu carrego as boas lembranças e os célebres ensinamentos.

Obrigado Thelma Lopes Silva e Larissa Tercilia Grizzo Thomassian por desempenharem a função de especialista/técnica do laboratório de Bioquímica com tanto amor e profissionalismo. Eu convivi diretamente com vocês por um longo período do meu doutorado. Certamente, nesse caminho, eu encontrei obstáculos e abismos, mas vocês, com toda competência, conselhos sábios e respeito me ajudaram a contornar as adversidades e construir

pontes para unir as passagens. Assim, nesta tese, é possível identificar muitos pontos provindos de vocês. Eu sei onde cada ponto está; eles estão guardados aqui e, principalmente, na minha pasta de gratidão!

Aos alunos de Iniciação científica

Durante o doutorado eu tive a honra de coorientar quatro alunos de iniciação científica: João Guilherme Lunardelli, Gabriel Camiloti, Leonardo Brito e Cecília Borges. Alguns já alçaram voo; outros estão prestes a decolar. Hoje, eu olho para trás e sinto uma profunda alegria em poder ver a evolução de cada um de vocês. Juntos nós estudamos, trabalhamos, comemoramos e, sobretudo, nos respeitamos. Nossa convivência sempre harmônica e fundamentada na “via de mão dupla” corroborava o meu desejo de ser professor. Por sinal, ora eu estava nesta função, ora eu era aluno. E vocês, compactuavam desse mesmo raciocínio. Por esse caminho, o meu aprendizado predominava sobre os meus ensinamentos, isso só poderia ser fruto de bons alunos. Enfim, se fosse preciso, por vocês, eu faria tudo de novo. Reafirmar o desejo de ser professor foi o segredo que vocês exaltaram em mim. Obrigado por tudo! Desejo que estes voos sejam repletos de muito sucesso. Tão certo eu estarei sempre aqui, torcendo e aplaudindo vocês!

Aos colaboradores dos artigos científicos

Os artigos científicos relacionados a esta tese tiveram a presença de importantes coautores, para que se pudessem alcançar excelentes resultados e, posteriormente, a publicação. Eu agradeço a parceria efetiva de vocês para a idealização de cada estudo. É importante lembrar que este documento apresenta uma equipe multidisciplinar, em que cada profissional desempenhou um papel específico diante de sua área de atuação. Eu reconheço a dedicação de cada um de vocês: Samira Niemeyer, Tommy Baumann, Thiago Carvalho, Adrian Lussi, Eduardo de Souza, Flávio Henrique Silva, Adelita Santiago, Danyelle Toyama, Edson Crusca, Reinaldo Marchetto, Flávia Levy, João Lunardelli, Talita Ventura, Leonardo Brito, Éven Taira, Marília Buzalaf, Cintia Tokuhara, Carlos Gironde, Natara Silva, Thamyris Carvalho, Beatriz de Souza, Samanta Moraes, Larissa Thomassian, Ana Carolina Magalhães, Rodrigo Oliveira, Joana Pieretti, Amedea Seabra, Cristiane Cardoso, Sônia Groisman e Marcela Rodrigues. Estimados colaboradores, muito obrigado.

À Universidade Federal de São Carlos e ao PPGGEv

A escolha desta Universidade para realizar o meu doutorado não foi ao acaso. Foi além dos meus objetivos concretos; chegou até aos meus sonhos. Talvez fosse mais cômodo escolher outras instituições para a realização do doutorado devido a minha localização, porém muitas características me deram forças e tomaram a minha atenção para a UFSCar, dentre elas, o reconhecimento nacional e internacional de sua qualidade de ensino, pesquisa e extensão. Em especial, o Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular (PPGGEv), o qual me despertou um grande interesse devido a minha formação de Biólogo, bem como o propósito em me aprofundar em uma área do conhecimento diferente da que eu havia obtido no mestrado. Isso realmente foi excêntrico e desafiador! Hoje, emocionado e com a sensação do dever quase cumprido, percebo que essa escolha já reflete positivamente em minha carreira profissional e pessoal. A esse respeito, tenho uma gratidão e um enaltecimento pelo corpo docente que me proporcionou vasto conhecimento durante as disciplinas oferecidas. Ademais, agradeço aos membros do Departamento, incluindo a Coordenação (Prof. Dr. Marcelo de Bello Cioffi), a Comissão de Pós-Graduação e a atenção oferecida pela assistente administrativa: Ivanildes Menezes.

À Faculdade de Odontologia de Bauru/Universidade de São Paulo

Nesta instituição eu tive o privilégio de desenvolver grande parte da pesquisa registrada nesta tese. Desta forma, eu agradeço à FOB/USP por me aceitar em sua ampla infraestrutura, incluindo a autorização do uso de equipamentos e materiais. Também enfatizo a minha admiração e os meus agradecimentos aos profissionais que contribuíram para a apresentação destes resultados. Muito obrigado diretores, professores, técnicos e servidores. A FOB/USP está intimamente ligada aos meus melhores sentimentos e aos bons momentos em que eu vivi.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

O apoio financeiro concedido pela FAPESP permitiu o desenvolvimento de objetivos científicos, bem como sonhos particulares. Apesar dos desafios econômicos presentes em nosso País, essa renomada agência está consolidada por uma excelente gestão para contornar

obstáculos, valorizando, assim, a pesquisa científica no Brasil. Muito obrigado FAPESP por confiar em nosso trabalho e pelo suporte financeiro concedido a esta tese. Em especial, quero destacar a aprovação do processo referente ao meu Doutorado (2017/04857-4), bem como a minha Bolsa de Estágio e Pesquisa no Exterior (BEPE: 2019/08437-5). Além disso, nós agradecemos a aprovação do auxílio regular (2018/12041-7) e a Bolsa de Iniciação Científica concedida aos alunos: João Guilherme Lunardelli (2017/26376-8), Gabriel Camiloti (2018/02345-9), Leonardo Brito (2021/02366-9) e Cecília Borges (2021/11152-2).

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)

A qualidade da educação do nível de pós-graduação está sob responsabilidade desta importante agência de âmbito federal. Dessa forma, eu gostaria de demonstrar a minha gratidão pela atenção fornecida aos pós-graduandos, tal como o apoio financeiro por meio de bolsas de estudo e a destinação de recursos para a execução de pesquisa científica. Em especial, para o nosso estudo (código de financiamento 001).

AGRADECIMENTO ESPECIAL

À minha orientadora Profa. Dra. Marília Afonso Rebelo Buzalaf

Querida Professora Marília, este agradecimento foi a minha última etapa da tese, mas eu quero destacar que isso não significa menor importância; pelo contrário, eu tenho inúmeros motivos para demonstrar o quanto a senhora foi essencial para a minha vida acadêmica e pessoal.

Hoje, eu me lembrei que tudo isso só foi possível porque, em 2010, a senhora abriu suas portas para me receber. Nesse passado, os meus 17 anos de vida refletiam apenas a minha falta de experiência; entretanto, lá no fundo, os meus objetivos já se convergiam para uma vida acadêmica. Isso, de fato, era a minha única certeza. O tempo passou e hoje vejo que nestes vinte e dois anos de orientação, as expectativas eram pequenas diante do que realmente se concretizou. Esta vitória veio exclusiva da senhora, que idealizou tudo o que eu almejava, tornando realidade todos os meus sonhos. Aliás, quantas boas lembranças nós acumulamos neste caminho, vibrando juntos por muitos momentos especiais, dentre eles, artigos publicados, prêmios, apresentações internacionais e excelentes resultados laboratoriais.

Em todas essas situações, a senhora demonstrava o seu lado humano, me acolhendo com carinho e atenção. Provável que isso seja fruto da sua fé e do seu amor. Pois, é nítido que essas características estão fixadas no seu coração e, como consequência, refletem abundantemente sobre suas atitudes, uma vez que esses dons são as únicas coisas que crescem à medida que se repartem. Também é nítido ver sua compaixão com as pessoas, sempre zelando o respeito. Para todos esses aspectos, é impossível identificar provas contrárias. A meu ver, outra de suas maiores qualidades, é a humildade. Esta virtude pode representar a base para todas as outras, levando-a para uma vida igualitária, em que não existem diferenças e, tampouco, preconceitos com os demais. Que benção, isso só pode ser Deus usando-a como instrumento de paz e luz para todas as pessoas que estão ao seu redor.

O mais bonito é ver que este seu lado humano caminha em conjunto com o seu lado profissional. Certamente, isso também é uma dádiva divina, pois não é à toa ver o magnífico destaque do seu reconhecimento profissional, o qual atravessa as fronteiras do nosso País. Aliás, ele já é definitivamente internacional. Dessa forma, não é exagero falar que mundo não seria o mesmo sem a sua obra. A senhora é uma profissional com a capacidade de surpreender a comunidade científica com suas descobertas, as quais estão representadas por quase

quatrocentos artigos científicos, além de livros e outros meios de comunicação. Também a sua inteligência e determinação andam de forma concomitante e são as vias para a conduzir ao mais alto patamar, isso é inquestionável e, sobretudo, merecido. A propósito, que honra ver a sua função de Diretora da FOB/USP disseminar o brilho exclusivo por tudo e por todos. Sem dúvida, a faculdade está em boas mãos, nós confiamos e reconhecemos profundamente esse trabalho árduo e constante que a senhora está desempenhando.

Eu estou chegando ao término de mais uma etapa, assim eu gostaria de lhe agradecer por transformar tantas vidas, principalmente a minha. Eu sempre observei que a palavra “Professor” está ligada ao poder transformador. Em minha história foram muitos professores que fizeram jus a essa afirmação, entretanto a senhora é a professora que mais está presente em minha jornada, como consequência, é a que mais transforma a minha vida para melhor. Eu mencionei essa frase no presente porque seus ensinamentos, mesmo que tenham ocorridos no passado, refletem diariamente a minha transformação. É por este caminho que eu também fico imaginando sobre a quantidade de seus ex alunos e orientados que tiveram suas carreiras transformadas, todos eles: da graduação à pós, seguindo a luz que a senhora acende em nós. Sem dúvida, somos felizes por estar ao seu lado, onde jamais existe desânimo, e sim o desejo profundo de um dia seguir os seus passos, com o intuito de também transformar vidas de alunos.

Para finalizar, gostaria de voltar à atenção ao primeiro parágrafo deste agradecimento à senhora, em que escrevi que esta homenagem foi última etapa da tese. Pois bem, tudo isso tem um significado especial para mim. Eu iniciei a escrita deste documento em fevereiro de 2022, compondo primeiramente o seu nome nas primeiras páginas. Hoje, a última palavra da tese é exclusivamente para a senhora, ela vem para demonstrar a sua presença do início ao fim do meu doutorado. Desta forma, eu concluo o mesmo todos os dias: a senhora é especial para mim. Professora Marília, obrigado por tudo o que a senhora fez em minha vida. A senhora tirou os meus sonhos lá do fundo e os trouxe para frente do meu caminho. É com o coração repleto de emoção e gratidão que digo que todos esses sonhos se tornaram realidades, graças ao seu lindo poder transformador. Eu desejo que a senhora tenha tudo o que há de melhor nesta vida, sobretudo, as bênçãos de Deus. A senhora está constantemente em minhas orações e no lugar mais profundo do meu coração.

Muito Obrigado, querida Professora Marília!

SÚMULA CURRICULAR

Formação acadêmica

2017 – 2022: Doutorado em Genética Evolutiva e Biologia Molecular (em andamento). Universidade Federal de São Carlos, UFSCAR, Brasil. Título: Engenharia de película adquirida para o controle da erosão dentária: avaliação *in situ* do potencial protetor de uma nova cistatina derivada da cana-de-açúcar (CaneCPI-5). Orientadora: Profa. Dra. Marília Afonso Rabelo Buzalaf. Financiamento: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP (17/04857-4).

2019 – 2020. Desenvolvimento de Estágio e Pesquisa no Exterior. Título: Engenharia da película adquirida para proteção contra a erosão dentária: uso de um novo refletômetro óptico portátil para avaliar o papel protetor de proteínas/peptídeos. Orientadores: Prof. Dr. Adrian Lussi e Prof. Dr. Thiago Saads Carvalho. Universidade de Berna - Berna - Suíça. Projeto de pesquisa com bolsa BEPE/FAPESP (Bolsas de Estágio e Pesquisa no Exterior / Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - Processo: 19/08437-5).

2015 – 2017: Mestrado em Ciências Odontológicas Aplicadas. Faculdade de Odontologia de Bauru - USP, FOB-USP, Brasil. Título: Análise proteômica da película adquirida formada sobre resinas compostas experimentais contendo ou não carga e/ou inibidores de proteases. Orientadora: Profa. Dra. Marília Afonso Rabelo Buzalaf. Financiamento: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP (14/25599-5).

2013 – 2014: Graduação em Ciências Biológicas (Bacharel). Universidade Sagrado Coração, Brasil. Título do Trabalho de Conclusão de Curso: Papel das cisteína catepsinas na erosão dentinária. Orientadora: Profa. Dra. Marília Afonso Rabelo Buzalaf. Financiamento: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP (13/19657-0).

2010 – 2012: Graduação em Ciências Biológicas (Licenciatura). Universidade Sagrado Coração, Brasil. Título do Trabalho de Conclusão de Curso: Avaliação da regeneração da musculatura estriada esquelética após a cirurgia experimental de tubularização. Orientador: Prof. Dr. Geraldo Marco Rosa Júnior. Financiamento: Fundação de Amparo à Pesquisa, FAP/USC.

Prêmios acadêmicos

Menção honrosa na área temática de Ciências Básicas, no evento XIV Jornada de Odontologia, Unisagrado. Brito L, **Pelá VT**, Taira EA, Henrique-Silva F, Buzalaf MAR. Uso do Reflectômetro Optipen para avaliar o efeito da aplicação de um gel contra desgaste erosivo no esmalte. 2022.

Menção honrosa na área temática de Ciências Básicas Aplicadas, Congresso Odontológico de Bauru (COB). **Pelá VT**, Niemeyer SH, Baumann T, Henrique-Silva F, Carvalho TS, Buzalaf MAR. Engenharia de película adquirida com uma combinação da CaneCPI-5 e NaF para a prevenção da erosão dentária. 2021.

Research in Prevention Travel Awards, Colgate - Increased salivary hemoglobin in reflux protects against dental erosion. 97th IADR - International Association for Dental Research, Martini T, Taira EA, **Pelá VT**, Ventura TMO, Buzalaf MAR Vancouver, Canadá, 2019.

Menção honrosa na categoria de Ciências Básicas / Paineis / Graduação na Jornada de Odontologia da USC - JOUSC/2018. Camiloti GD, **Pelá VT**, Lunardelli JGQ; Braga AS; Magalhães AC, Buzalaf MAR. Avaliação do efeito de uma nova cistatina derivada da cana-de-açúcar sobre a viabilidade do biofilme microcosmo. Universidade Sagrado Coração, 2018.

Menção honrosa na categoria de Ciências Básicas / Oral / Graduação na Jornada de Odontologia da USC - JOUSC/2018. Tuler HRF, **Pelá VT**, Lunardelli JGQ, Camiloti GD, Buzalaf MAR. Análise proteômica da película adquirida formada no esmalte dentário: Desenvolvimento de uma nova técnica de coleta. Universidade Sagrado Coração, 2018.

Menção honrosa na área de Ciências Básicas, na categoria painéis / pós-graduação / pesquisa. **Pelá VT**, Leite AL, Bissaya A, Levy FM, Edwardson JM, Silva FH, Buzalaf MAR. Faculdade de Odontologia de Bauru / Universidade de São Paulo, 2016.

Premiação na área de Ciências Básicas Pós-graduação / categoria painéis / pesquisa. **Pelá VT**, Leite AL, Martini T, Ventura TMS, Buzalaf MAR. Efeito protetor da incorporação da incorporação da canacistatina na película adquirida contra a erosão dentária. XI Jornada Odontológica da USC, 2016.

Artigos publicados

Pelá VT, Brito L, Taira EA, Henrique-Silva F, Pieretti JC, Seabra AB, de Almeida Baldini Cardoso C, de Souza EP, Groisman S, Rodrigues MC, Lussi A, Carvalho TS, Buzalaf MAR. Preventive effect of chitosan gel containing CaneCPI-5 against enamel erosive wear *in situ*. Clin Oral Investig. 2022.

Reis FN, Francese MM, da Silva NDG, **Pelá VT**, Câmara JVF, Trevizol JS, Pieretti JG, Seabra AB, Pessan JP, Honorio HM, Crusca E, Marchetto R, Buzalaf MAR. Gels containing statherin-derived peptide protect against enamel and dentin erosive tooth wear in vitro. Mech Behav Biomed Mater. 2022. Artigo aceito para publicação.

Gironda CC, Pelá VT, Henrique-Silva F, Delbem ACB, Pelim Pessan JP, Buzalaf MAR. New insights into the anti-erosive property of a sugarcane-derived cystatin: different vehicle of application and potential mechanism of action. J Appl Oral Sci. 2022. Online ahead of print.

Loureiro C, Buzalaf MAR, Pessan JP, Ventura TMO, **Pelá VT**, Ribeiro APF, Jacinto RC. Proteomic analysis of infected root canals with apical periodontitis in patients with type 2 diabetes mellitus: A cross-sectional study. Int Endod J. 2022. doi: 10.1007/s00784-022-04600-z. Online ahead of print.

Levy FM, Braga AS, **Pelá VT**, Lavender S, Zhang D, Pilch S, Malheiros Z, Stewart B, Magalhães AC, Buzalaf MAR. Characterization of white spot lesions formed on human enamel under microcosm biofilm for different experimental periods. J Appl Oral Sci. 2022. e20210560. doi: 10.1111/iej.13794. Online ahead of print. doi: 10.1590/1678-7757-2021-0560.

Pelá VT, Niemeyer SH, Baumann T, Levy FM, Henrique-Silva F, Lussi A, Carvalho TS, Buzalaf MAR. Acquired Pellicle Engineering Using a Combination of Organic (Sugarcane Cystatin) and Inorganic (Sodium Fluoride) Components against Dental Erosion. Caries Res. 2022;56(2):138-145. doi: 10.1159/000522490.

Pelá VT, Lunardelli JGQ, Tokuhara CK, Gironda CC, Silva NDG, Carvalho TS, Santiago AC, Souza BM, Moraes SM, Henrique-Silva F, Magalhães AC, Oliveira RC, Buzalaf MAR. Safety and *In situ* Antierosive Effect of CaneCPI-5 on Dental Enamel. J Dent Res. 2021 Nov;100(12):1344-1350. doi: 10.1177/00220345211011590.

Silva NC, Ventura TMO, Oliveira BP, Dos Santos NM, **Pelá VT**, Buzalaf MAR, Rodrigues JA. Proteomic profile of the acquired enamel pellicle of professional wine tasters with erosive tooth wear. *Eur J Oral Sci.* 2021 Mar 30;e12779. doi: 10.1111/eos.12779.

Pelá VT, Buzalaf MAR, Niemeyer SH, Baumann T, Henrique-Silva F, Toyama D, Crusca E, Marchetto R, Lussi A, Carvalho TS. Acquired pellicle engineering with proteins/peptides: Mechanism of action on native human enamel surface. *J Dent.* 2021 Feb 20;107:103612. doi: 10.1016/j.jdent.2021.103612. doi: 10.1016/j.jdent.2021.103612.

Pelá VT, Braga AS, Camiloti GD, Lunardelli JGQ, Pires JG, Toyama D, Santiago AC, Henrique-Silva F, Magalhães AC, Buzalaf MAR. Antimicrobial and anti-caries effects of a novel cystatin from sugarcane on saliva-derived multi-species biofilms. *Swiss Dent J.* 2021 Jan 29;131(5).

Loureiro C, Buzalaf MAR, Moraes FRN, Ventura TMO, **Pelá VT**, Pessan JP, Jacinto RC. Quantitative proteomic analysis in symptomatic and asymptomatic apical periodontitis. *Int Endod J.* 2021 Jan 22. doi: 10.1111/iej.13480.

Pelá VT, Lunardelli JGQ, Ventura TMO, Camiloti GD, Baumann T, Carvalho TS, Lussi A, Buzalaf MAR. Proteomic profiles of the acquired enamel pellicle formed *in vitro*, *in situ*, or *in vivo*. *European Journal of Oral Sciences.* v.128, p.487 - 494, 2020. doi: 10.1111/eos.12744.

Carvalho TS, Araújo TT, Ventura TMO, Dionizio A, Câmara JVF, Moraes SM, **Pelá VT**, Martini T, Leme JC, Derbotolli ALB, Grizzo LT, Crusca E, Shibao PYT, Marchetto R, Henrique-Silva F, Pessan JP, Buzalaf MAR. Acquired pellicle protein-based engineering protects against erosive demineralization. *J Dent.* 2020 Nov;102:103478. doi: 10.1016/j.jdent.2020.103478.

Taira EA, Carvalho G, Ferrari CR, Martini T, **Pelá VT**, Ventura TMO, Dionizio AS, Crusca E, Marchetto R, Buzalaf MAR. Statherin-derived peptide protects against intrinsic erosion. *Archives of oral biology*, v.119, p.104890 - , 2020. doi: 10.1016/j.archoralbio.2020.104890.

Pelá VT, Ventura TMO, Buzalaf MAR. Optimizing the formation of the acquired enamel pellicle *in vitro* for proteomic analysis. Journal of applied oral science (online). v.28, p.20200189. 2020. doi: 10.1590/1678-7757-2020-0189.

Loureiro C, Buzalaf MAR, Pessan JP, Moraes FRN, **Pelá VT**, Ventura TMO, Castilho RC. Comparative analysis of the proteomic profile of the dental pulp in different conditions. A pilot study. Brazilian Dental Journal. v.31, p.319 - 336, 2020. doi: 10.1590/0103-6440202003167.

Martini T, Rios D, Dionizio A, Cassiano LPS, **Pelá VT**, Silva CMS, Taira EA, Ventura TMO, Magalhães AC, Carvalho TS, Baumann T, Lussi A, de oliveira RB, Palma-dibb RG, Buzalaf MAR. Salivary hemoglobin protects against erosive tooth wear in gastric reflux patients. Caries Research. v.54, p.466 - 474, 2020. doi: 10.1159/000507110.

Braga AS, Girotti LD, de Melo Simas LL, Pires JG, **Pelá VT**, Buzalaf MAR, Magalhães AC. Effect of commercial herbal toothpastes and mouth rinses on the prevention of enamel demineralization using a microcosm biofilm model. Braga AS, Girotti LD, de Melo Simas LL, Pires JG, Pelá VT, Buzalaf MAR, Magalhães AC. Biofouling. 35(7):796-804. 2019. doi: 10.1080/08927014.2019.1662897.

Pelá VT, Prakki A, Wang L, Ventura TMS, de Souza E Silva CM, Cassiano LPS, Brianezzi LFF, Leite AL, Buzalaf MAR. The influence of fillers and protease inhibitors in experimental resins in the protein profile of the acquired pellicle formed *in situ* on enamel-resin specimens. Arch Oral Biol. 2019. doi: 10.1016/j.archoralbio.2019.104527.

Pelá VT, Cassiano LPS, Ventura TMS, Souza-e-silva CM, Gironda CC, Rios D, Buzalaf MAR. Proteomic analysis of the acquired enamel pellicle formed on human and bovine tooth: a study using the Bauru *in situ* pellicle model (BISPM). J Appl Oral Sci. 2018 Dec 10;27:e20180113. doi: 10.1590/1678-7757-2018-0113.

Charone S, Küchler EC, Leite AL, Fernandes MS, **Pelá VT**, Martini T, Brondino BM, Magalhães AC, Dionisio TJ, Santos CF, Buzalaf MAR. Analysis of Polymorphisms in Genes Differentially Expressed in the Enamel of Mice with Different Genetic Susceptibilities to Dental Fluorosis. Caries Res. 2018 Aug 27;53(2):228-233. doi: 10.1159/000491554.

Santiago AC, Khan ZN, Miguel MC, Gironda CC, Soares-costa A, **Pelá VT**, Leite AL, Edwardson JM, Buzalaf MAR, Henrique-silva F. A New Sugarcane Cystatin Strongly Binds to Dental Enamel and Reduces Erosion. *J Dent Res.* 2017 Aug;96(9):1051-1057. doi: 10.1177/0022034517712981.

Zarella BL, Cardoso CA, **Pelá VT**, Kato MT, Tjäderhane L, Buzalaf MA. The role of matrix metalloproteinases and cysteine-cathepsins on the progression of dentine erosion. *Arch Oral Biol.* 2015 Sep;60(9):1340-5. doi: 10.1016/j.archoralbio.2015.06.011.

Artigos submetidos

Pelá VT, Ventura TMO, Taira EA, Thomassian LTG, Henrique-Silva F, Groisman S, Carvalho TS, Lussi A, Buzalaf MAR. Use of Reflectometer and effect of CaneCPI-5 for initial erosion *in vivo*. *Journal of Dental Research*, 2022.

Reis FN, Francese MM, da Silva NDG, **Pelá VT**, Câmara JVF, Trevizol JS, Honorio HM, Crusca E, Marchetto R, Buzalaf MAR. Solutions containing a statherin-derived peptide reduce enamel erosion *in vitro*. *Caries Research*, 2022.

Taira EA, Ferraria CR, Carvalho G, **Pelá VT**, Ventura TMO, Crusca E, Marchetto R, Buzalaf MAR. Protective effect of rinsing with statherin-derived peptide against intrinsic tooth wear on enamel and dentin: *In situ* study. *Clinical Oral Investigations*, 2022.

Ventura TMO, Baumann T, **PELÁ VT**, Niemeyer SH, Carvalho TS, Marchetto R, Buzalaf MAR. New insights into the protective effect of Statherin-derived peptide for different acquired pellicle formation times on native human enamel surface. *Scientific Reports*, 2022.

Carvalho TS, Raptis Y, **Pelá VT**, Buzalaf MAR, Baumman T, Niemeyer S. Effect of cannabis-based teas on dentine erosion. *Archives of Oral Biology*, 2022.

Loureiro C, Buzalaf MAR, Ventura TMO, **Pelá VT**, Rodrigues GWL, Andrade JG, Pessan JP, Jacinto RC. Acute apical abscess vs. apical periodontitis: a quantitative and qualitative proteomic analysis. *Clinical Oral Investigations*, 2022.

Mais informações estão disponíveis em: <http://lattes.cnpq.br/3569814728395862>.

RESUMO

Atualmente, o desenvolvimento científico da cistatina derivada da cana-de-açúcar (CaneCPI-5) ganhou forças no controle do desgaste dentário erosivo (DDE). Entretanto, para que esta proteína recombinante possa ser comercialmente utilizada, é importante verificar estratégias relacionadas ao seu uso, compreendendo a sua translação das ciências básicas para a aplicação clínica, a fim de direcionar o desenvolvimento de novos produtos odontológicos para a proteção contra o DDE. Assim, o objetivo da presente tese foi avaliar o efeito protetor da CaneCPI-5 em diferentes protocolos de engenharia de película adquirida (*in vitro*, *in situ* e *in vivo*), bem como testá-la em diferentes combinações e veículos de aplicação contra a erosão dentária inicial e o DDE do esmalte. Para que este objetivo fosse alcançado, foram realizados sete capítulos experimentais, os quais estão descritos a seguir. No primeiro capítulo, foi desenvolvido um protocolo de formação e coleta de película adquirida do esmalte (PAE) *in vitro* para a análise proteômica. No segundo capítulo, foi demonstrada a diferença do perfil proteico da PAE formada nas condições *in vitro*, *in situ* e *in vivo*. O terceiro capítulo foi destinado a entender o mecanismo de ação da CaneCPI-5 e de outros tratamentos (isolados ou combinados) na presença ou na ausência da PAE sobre a superfície nativa, usando um protocolo de erosão dentária inicial *in vitro*. Posteriormente, o quarto capítulo mostrou que a combinação da CaneCPI-5 com um componente inorgânico (fluoreto de sódio), favoreceu a proteção do esmalte contra a erosão dentária inicial *in vitro*. O quinto capítulo foi desenhado primeiramente para demonstrar a segurança da CaneCPI-5 quando em contato com fibroblastos gengivais, por meio de ensaios de citotoxicidade. Em adição, neste capítulo houve um avanço clínico do uso da CaneCPI-5 (quando aplicada em forma de solução sobre o esmalte) por meio de um protocolo *in situ*, o qual demonstrou que esta proteína apresentou um efeito protetor contra desgastes mais severos, envolvendo a erosão e a erosão associada à abrasão. Posteriormente, o sexto capítulo também demonstrou a eficácia da CaneCPI-5 quando ela foi incorporada a um veículo de aplicação diferente (gel de quitosana) para a prevenção da erosão e da erosão associada à abrasão *in situ*. Por fim, no último capítulo (sétimo), foi demonstrada a real interpretação clínica do efeito protetor do enxaguatório com CaneCPI-5, bem como o uso do Reflectômetro Optipen para avaliação da erosão dentária inicial *in vivo*. Em conclusão, a presente tese apresentou várias estratégias inovadoras sobre a eficácia do uso da CaneCPI-5 contra a erosão dentária inicial e o DDE do esmalte. Estes resultados favoreceram o direcionamento do *design* de novos produtos odontológicos.

Palavras-chave: Canacistatina; Erosão dentária; Saliva; Proteção; Película adquirida.

ABSTRACT

Currently, the scientific development of sugarcane-derived cystatin (CaneCPI-5) has gained strength in the control of erosive tooth wear (ETW). However, for this recombinant protein to be commercially used, it is important to verify the strategies related to its use, as well as including its translation from basic sciences to clinical application, in order to direct the development of new dental products to protect against ETW. Thus, the objective of the present thesis was to evaluate the protective effect of CaneCPI-5 in different acquired pellicle engineering protocols (*in vitro*, *in situ* and *in vivo*), as well as to test it in different combinations and application vehicles against ETW. In order to achieve this objective, seven experimental chapters were carried out, which are described below. In the first chapter, an *in vitro* acquired enamel pellicle (AEP) formation and collection protocol for proteomic analysis was developed. In the second chapter, the difference in the protein profile of the AEP was demonstrated when the *in vitro*, *in situ* and *in vivo* conditions were compared. The third chapter was intended to understand the mechanism of action of CaneCPI-5 and other treatments (alone or combined) in the presence or absence of acquired pellicle on native enamel specimens, using an *in vitro* dental erosion protocol. Subsequently, the fourth chapter showed that the combination of CaneCPI-5 with an inorganic component (sodium fluoride) favored enamel protection against initial dental erosion *in vitro*. The fifth chapter was designed primarily to ensure that CaneCPI-5 was safe for gingival fibroblast cells through *in vitro* cytotoxicity assays. In addition, in this chapter there was a clinical advance in the use of CaneCPI-5 (in solution form), through an *in situ* protocol, which demonstrated that this protein has a protective effect against more severe wear, involving erosion and erosion associated with abrasion. Subsequently, the sixth chapter also demonstrated the effectiveness of CaneCPI-5 when it was incorporated into a different application vehicle (chitosan gel) for the prevention of erosion and erosion associated with *in situ* abrasion. Finally, in the last chapter (seventh), it was demonstrated a real clinical interpretation of the protective effect of a mouthrinse with CaneCPI-5 and the use of the Reflectometer Optipen for the analysis of initial dental erosion *in vivo*. In conclusion, the present thesis demonstrated several innovative strategies on the use of CaneCPI-5 against enamel ETW. These results favor the design of new dental products.

Keywords: Acquired pellicle; Canacystatin; Dental erosion; Protection; Saliva.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Resumo do esquema metodológico <i>in vitro</i> e diagrama de Venn.....	56
Figura 2. Resumo do esquema metodológico das diferentes condições de PAE....	68
Figura 3. Diagrama de Venn entre das diferentes condições.....	71
Figura 4. Esquema metodológico da presença ou ausência da PAE <i>in vitro</i>	97
Figura 5. Comparação da solubilização do peptídeo de estaterina em água e tampão fosfato.....	99
Figura 6. Relação da intensidade de reflexão da superfície (%IRS).....	100
Figura 7. Análise do cálcio liberado no ácido cítrico.....	102
Figura 8. Imagens de microscopia eletrônica de varredura.....	103
Figura 9. Modelo do mecanismo de ação para cada tratamento.....	105
Figura 10. Esquema do protocolo de erosão dentária inicial <i>in vitro</i>	114
Figura 11. Porcentagem de alteração da microdureza de superfície (%SMC).....	116
Figura 12. Porcentagem da intensidade de reflexão da superfície (%IRS).....	117
Figura 13. Análise de cálcio presente no ácido cítrico.....	118
Figura 14. Esquema metodológico <i>in situ</i> (tratamento com solução).....	132
Figura 15. Ensaio colorimétrico por redução de MTT.....	133
Figura 16. Imagens obtidas de fibroblasto gengival humano.....	134
Figura 17. Microscopia Confocal de Varredura a Laser.....	135
Figura 18. Desgaste erosivo médio do esmalte <i>in situ</i> por perfilometria (μm).....	136
Figura 19. Esquema metodológico <i>in situ</i> (tratamento com gel).....	147
Figura 20. Desgaste erosivo médio do esmalte <i>in situ</i> por perfilometria (μm).....	149
Figura 21. Porcentagem da intensidade de reflexão média da superfície do esmalte bovino, avaliada pelo Reflectômetro Optipen.....	150
Figura 22. Correlação entre os métodos <i>in situ</i>	151
Figura 23. Esquema metodológico <i>in vivo</i>	162
Figura 24. Porcentagem de intensidade de reflexão do esmalte <i>in vivo</i> avaliada pelo Reflectômetro Optipen.....	164
Figura 25. Análise do cálcio (mM) liberado no ácido cítrico.....	165
Figura 26. Correlação entre os métodos <i>in vivo</i>	166

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação das proteínas da PAE <i>in vitro</i>	58
Tabela 2. Classificação das proteínas identificadas na PAE.....	72
Tabela 3. Comparação entre as condições <i>in vitro</i> e <i>in situ</i>	84
Tabela 4. Comparação entre as condições <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	85
Tabela 5. Comparação entre as condições <i>in situ</i> e <i>in vivo</i>	86

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AC: ácido cítrico

AC+SDS: ácido cítrico + dodecil sulfato de sódio

AMSF: análise de microdureza de superfície final

AMSi: análise de microdureza de superfície inicial

ANOVA: análise de variância

CaneCPI-5: cistatina derivada da cana-de-açúcar 5

BISPM: modelo de película *in situ* de Bauru (Bauru *in situ* pellicle model)

BEWE: índice básico do desgaste erosivo (basic erosive wear examination)

Ca: cálcio

DDE: desgaste dentário erosivo

La(NO₃)₃·6H₂O: nitrato de lantânio hexahidratado

Ca(SnF₃)₂: produto da reação entre o cálcio e fluoreto de estanho

CAAE: certificado de apresentação de apreciação ética

CaF₂: fluoreto de cálcio

cm²: centímetro quadrado

CO₂: gás carbônico

CPAE: com a presença de película adquirida do esmalte

DAPI: 4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride

E. coli: *Escherichia coli*

Elmex[®]: solução comercial contra erosão dentária

ETO: óxido de etileno

ETW: desgaste dentário erosivo (erosive tooth wear)

F⁻: íon fluoreto

FGH: fibroblasto gengival humano

FMOC: fluorenilmetoxicarbonil protetor

g: grama

H: Átomo de hidrogênio

H⁺: Íon de Hidrogênio

IC: Intervalo de confiança

In situ: no ambiente natural

In vitro: fora do organismo vivo

In vivo: diretamente no organismo vivo

IPTG: Isopropil-beta-D-Tiogalactosídeo

IRSF: intensidade de reflexão da superfície final

IRSi: intensidade de reflexão da superfície inicial

KgF/cm²: Quilograma força por centímetro quadrado

Knoop: endentador de diamante da análise de microdureza

kV: quivolt

LC-ESI-MS/MS: cromatografia líquida acoplada à ionização por electrospray e espectrometria de massas em *tandem* (liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry)

M: molar

mA: miliampère

MEV: microscopia eletrônica de varredura

mL: mililitro

mm: milímetro

mM: milimolar

mm²: milímetro quadrado

MS: espectrômetro de massa

MTT: brometo de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio

N: Newton

NaF: fluoreto de sódio

NaOCl: hipoclorito de sódio

NEM: N-Etilmaleimida (N-Ethylmaleimide)

NH₄HCO₃: bicarbonato de amônio

nm: nanômetro

nmol: nanomol

n°: número

PA: película adquirida

PAE: película adquirida do esmalte

PBS: tampão fosfato-salino (phosphate buffered saline)

pH: potencial hidrogeniônico

PLGS: proteinlynx global server™

PMSF: fenilmetano sulfonil fluoreto

ppm: parte por milhão

ppmF: parte por milhão de fluoreto

PRP: proteína rica em prolina

PRPs: proteínas ricas em prolinas

RIPA: ensaio de radioimunoprecipitação (radioimmuno precipitation assay)

rpm: rotação por minuto

s: segundo

SDS: dodecil sulfato de sódio

SDS+AC: dodecil de sódio sulfato + ácido cítrico

$\text{Sn}_3\text{F}_3\text{PO}_4$: produto da reação entre fluoreto de estanho e a hidroxiapatita

SnCl_2 : Cloreto de estanho

NaF : fluoreto de sódio

AmF : fluoreto de amina

SnCl_2 : Cloreto de estanho

SnF_2 : fluoreto de estanho

SPAE: sem película adquirida do esmalte

Tris-HCl: tris hidroximetil aminometano hidrocloreto

Triton X-100: Surfactante Aniônico

UI/mL: Unidade Internacional/ mililitro

UPLC: cromatografia líquida de alta eficiência (ultra-performance liquid chromatography)

V/V: volume/ volume

®: marca registrada

°C: grau Celsius

μl: microlitro

%AMS: porcentagem de alteração da microdureza superficial

%IRS: porcentagem da intensidade de reflexão da superfície

<: menor

±: desvio para mais e para menos

&: e comercial

%: Porcentagem

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	38
1.1 SALIVA.....	38
1.2 PELÍCULA ADQUIRIDA.....	39
1.3 DESGASTE DENTÁRIO EROSIVO.....	41
1.4 DIAGNÓSTICOS E MEDIDAS INTERVENTIVAS PARA O CONTROLE DO DESGASTE DENTÁRIO EROSIVO.....	44
1.5 ENGENHARIA DE PELÍCULA ADQUIRIDA.....	46
1.6 CISTATINA DERIVADA DA CANA-DE-AÇÚCAR (CANECPI-5).....	47
1.7 ESTRATÉGIAS PARA O DESENVOLVIMENTO DE PRODUTOS ODONTOLÓGICOS COM CANECPI-5.....	49
2 OBJETIVOS.....	51
2.1 OBJETIVO GERAL.....	51
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	51
3 CAPÍTULO 1: PADRONIZAÇÃO DA FORMAÇÃO E COLETA DA PELÍCULA ADQUIRIDA DO ESMALTE <i>IN VITRO</i> PARA A IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS POR ESPECTROMETRIA DE MASSA.....	53
3.1 INTRODUÇÃO.....	54
3.2 OBJETIVO.....	55
3.3 HIPÓTESE NULA.....	55
3.4 MATERIAL E MÉTODOS.....	55
3.5 PRINCIPAIS RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	56
3.6 CONCLUSÃO.....	62
4 CAPÍTULO 2: COMPARAÇÃO DO PERFIL PROTEÔMICO DA PELÍCULA ADQUIRIDA DO ESMALTE FORMADA EM <i>IN VITRO</i>, <i>IN SITU</i> OU <i>IN VIVO</i>.....	63
4.1 INTRODUÇÃO.....	64
4.2 OBJETIVO.....	65
4.3 HIPÓTESE NULA.....	65
4.4 MATERIAL E MÉTODOS.....	65
4.4.1 Aspectos éticos.....	65

4.4.2 Seleção dos participantes da pesquisa.....	66
4.4.3 Preparo dos espécimes de esmalte humano.....	66
4.4.4 Coleta da saliva não estimulada.....	67
4.4.5 Experimento <i>in vitro</i>	67
4.4.6 Experimento <i>in situ</i>	68
4.4.7 Experimento <i>in vivo</i>	69
4.4.8 Preparo da PAE para análise proteômica.....	69
4.4.9 Análise proteômica livre de marcadores.....	70
4.5 RESULTADOS.....	71
4.5.1 Identificação de proteínas totais e para cada grupo.....	71
4.5.2 Diferença de expressão das proteínas entre <i>in vitro versus in situ</i>	83
4.5.3 Diferença de expressão das proteínas entre <i>in vitro versus in vivo</i>	84
4.5.4 Diferença de expressão das proteínas entre <i>in situ versus in vivo</i>	85
4.6 DISCUSSÃO.....	87
4.7 CONCLUSÃO.....	90
5 CAPÍTULO 3: ENGENHARIA DE PELÍCULA ADQUIRIDA COM PROTEÍNAS/PEPTÍDEOS: MECANISMO DE AÇÃO NA SUPERFÍCIE NATIVA DO ESMALTE HUMANO <i>IN VITRO</i>.....	91
5.1 INTRODUÇÃO.....	92
5.2 OBJETIVOS.....	93
5.3 HIPÓTESES NULAS.....	94
5.4 MATERIAL E MÉTODOS.....	94
5.4.1 Seleção dos participantes e coleta da saliva estimulada.....	94
5.4.2 Preparo dos espécimes de esmalte humano nativo.....	94
5.4.3 Aquisição das proteínas e peptídeos para os tratamentos.....	95
5.4.4 Grupos e procedimentos experimentais.....	96
5.4.5 Relação da intensidade de reflexão da superfície (%IRS).....	97
5.4.6 Análise do cálcio liberado no ácido cítrico (AC).....	97
5.4.7 Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	98
5.4.8 Análise estatística.....	98
5.5 RESULTADOS.....	98
5.5.1 Comparação do peptídeo de estaterina solubilizado em água ou solução tampão.....	98

5.5.2 Mecanismo de ação das proteínas/peptídeos pelo Reflectômetro.....	99
5.5.3 Mecanismo de ação das proteínas/peptídeos pela análise de cálcio.....	101
5.5.4 Microscopia eletrônica de varredura da superfície do esmalte nativo.....	102
5.6 DISCUSSÃO.....	103
5.7 CONCLUSÃO.....	108
6 CAPÍTULO 4: ENGENHARIA DE PELÍCULA ADQUIRIDA USANDO UMA COMBINAÇÃO DE COMPONENTES ORGÂNICOS (CISTATINA DA CANA-DE-AÇÚCAR) E INORGÂNICOS (FLUORETO DE SÓDIO) CONTRA A EROÇÃO DENTÁRIA.....	109
6.1 INTRODUÇÃO.....	110
6.2 OBJETIVO.....	111
6.3 HIPÓTESE NULA.....	111
6.4 MATERIAL E MÉTODOS.....	112
6.4.1 Questões éticas.....	112
6.4.2 Preparo dos espécimes.....	112
6.4.3 Coleta da saliva humana.....	112
6.4.4 Produção recombinante da CaneCPI-5.....	113
6.4.5 Tratamento, incubação da saliva e desafio ácido.....	113
6.4.6 Porcentagem da alteração da microdureza da superfície.....	114
6.4.7 Porcentagem da intensidade de reflexão da superfície.....	114
6.4.8 Análise do cálcio liberado no ácido cítrico.....	114
6.4.9 Análise estatística.....	115
6.5 RESULTADOS.....	115
6.5.1 Porcentagem de alteração da microdureza da superfície.....	115
6.5.2 Porcentagem da intensidade de reflexão da superfície.....	116
6.5.3 Análise do cálcio liberado no ácido cítrico.....	117
6.6 DISCUSSÃO.....	118
6.7 CONCLUSÃO.....	122
7 CAPÍTULO 5: SEGURANÇA E EFEITO ANTIEROSIVO <i>IN SITU</i> DA CANECPI-5 NO ESMALTE DENTÁRIO.....	123
7.1 INTRODUÇÃO.....	124
7.2 OBJETIVOS.....	125
7.3 HIPÓTESES NULAS.....	125

7.4 MATERIAL E MÉTODOS.....	125
7.4.1 Aspectos éticos.....	125
7.4.2 Produção recombinante da CaneCPI-5.....	126
7.4.3 Estudo 1: Segurança da CaneCPI-5 em fibroblastos.....	126
7.4.3.1 Cultura de células.....	126
7.4.3.2 Ensaio de Citotoxicidade.....	126
7.4.3.3 Microscopia Confocal de Fluorescência.....	127
7.4.3.4 Coloração de Hematoxilina Eosina (HE).....	127
7.4.3.5 Análise estatística.....	127
7.4.4 Estudo 2: Eficácia da CaneCPI-5 contra erosão associada ou não à abrasão do esmalte <i>in situ</i>.....	128
7.4.4.1 Obtenção dos dentes e preparo dos espécimes de esmalte.....	128
7.4.4.2 Processo de polimento dos espécimes.....	128
7.4.4.3 Análise inicial de perfilometria de contato.....	129
7.4.4.4 Seleção dos participantes.....	129
7.4.4.5 Preparo dos aparelhos palatinos.....	129
7.4.4.6 Grupos experimentais.....	130
7.4.4.7 Orientações e procedimentos experimentais <i>in situ</i>	130
7.4.4.8 Tratamentos, desafios erosivos e abrasivos.....	131
7.4.4.9 Análise final por perfilometria de contato.....	132
7.4.4.10 Análise estatística.....	132
7.5 RESULTADOS.....	133
7.5.1 Efeitos da CaneCPI-5 sobre os fibroblastos gengivais humanos.....	133
7.5.2 Efeito protetor da CaneCPI-5 contra a erosão e abrasão <i>in situ</i>.....	135
7.6 DISCUSSÃO.....	136
7.7 CONCLUSÃO.....	139
8 CAPÍTULO 6: EFEITO PREVENTIVO DO GEL DE QUITOSANA CONTENDO CANECPI-5 CONTRA O DESGASTE EROSIVO DO ESMALTE <i>IN SITU</i>.....	140
8.1 INTRODUÇÃO.....	141
8.2 OBJETIVO.....	142
8.3 HIPÓTESE NULA.....	142
8.4 MATERIAL E MÉTODOS.....	142

8.4.1	Questões éticas e seleção dos participantes.....	142
8.4.2	Corte e polimento dos espécimes de esmalte bovino.....	143
8.4.3	Preparo do aparelho palatino.....	144
8.4.4	Formulação dos géis e produção recombinante da CaneCPI-5.....	144
8.4.5	Orientações aos participantes.....	145
8.4.6	Protocolo experimental <i>in situ</i>	145
8.4.7	Medição do desgaste do esmalte por perfilometria.....	147
8.4.8	Medição do desgaste do esmalte pelo Reflectômetro Optipen.....	148
8.4.9	Análise estatística.....	148
8.5	RESULTADOS.....	149
8.5.1	Medição do desgaste do esmalte por perfilometria.....	149
8.5.2	Medição do desgaste do esmalte pelo Reflectômetro Optipen.....	150
8.5.3	Correlação entre a perfilometria e a reflectometria.....	151
8.6	DISCUSSÃO.....	151
8.7	CONCLUSÃO.....	156
9	CAPÍTULO 7: USO DO REFLECTOMETER E O EFEITO DA ENGENHARIA DE PELÍCULA ADQUIRIDA COM CANECPI-5 NA EROSÃO INICIAL <i>IN VIVO</i>	157
9.1	INTRODUÇÃO.....	158
9.2	OBJETIVO.....	159
9.3	HIPÓTESES NULAS.....	159
9.4	MATERIAL E MÉTODOS.....	160
9.4.1	Delineamento experimental.....	160
9.4.2	Seleção dos participantes.....	160
9.4.3	Orientações aos participantes.....	160
9.4.4	Produção recombinante da CaneCPI-5.....	161
9.4.5	Tipos de tratamento na forma de bochecho.....	161
9.4.6	Protocolo experimental <i>in vivo</i>	161
9.4.7	Medição da erosão dentária pelo Reflectômetro Optipen.....	162
9.4.8	Análise de cálcio pelo método colorimétrico de Arsenazo III.....	163
9.4.9	Análise estatística.....	163
9.5	RESULTADOS.....	163
9.5.1	Medição da erosão dentária por Reflectômetro Optipen.....	163

9.5.2 Análise de cálcio liberado no ácido cítrico.....	164
9.5.3 Correlação entre a reflectometria e a liberação de cálcio para o ácido cítrico.....	165
9.6 DISCUSSÃO.....	166
9.7 CONCLUSÃO.....	170
10 DISCUSSÃO GERAL DOS RESULTADOS OBTIDOS NA TESE.....	171
11 CONCLUSÕES.....	175
11.1 CONCLUSÕES ESPECÍFICAS.....	175
11.2 CONCLUSÃO GERAL.....	176
12 REFERÊNCIAS.....	177
APÊNDICE 1.....	189
APÊNDICE 2.....	190
APÊNDICE 3.....	191
APÊNDICE 4.....	192
APÊNDICE 5.....	193
APÊNDICE 6.....	194
APÊNDICE 7.....	195
ANEXO 1.....	196

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 Saliva

A saliva é um importante fluido presente na cavidade oral, sendo produzida principalmente pela secreção das glândulas salivares (maiores e menores) (PEDERSEN *et al.*, 2018). As glândulas maiores são representadas pela parótida, submandibular e sublingual, as quais são responsáveis por cerca de 90% da produção de saliva (de perfil seroso). Neste tipo de saliva predominam proteínas e enzimas (CARPENTER, 2013). Por outro lado, as glândulas menores estão situadas na borda lateral da língua, no palato e na mucosa. Elas secretam uma quantidade menor de saliva (cerca de 10%) e são responsáveis pela produção de saliva de perfil mucoso, com a função de lubrificação (CARPENTER, 2013).

Em adição, a saliva também é composta pelo fluido gengival crevicular, o qual pode estar presente em maiores quantidades diante de um processo inflamatório, como, por exemplo, em uma doença periodontal (ISOLA, 2022). Também pode ocorrer a presença de células descamadas devido ao desenvolvimento de neoplasias (SAHEBJAMEE *et al.*, 2009). Estas diferenças no perfil salivar estão sendo utilizadas em estudos focados sobre biomarcadores para o diagnóstico de doenças, principalmente àquelas relacionadas à cavidade oral, dentre elas, a Síndrome de Sjögren e o câncer de boca (KHURSHID *et al.*, 2018; BUZALAF *et al.*, 2020; MELETI *et al.*, 2020; DI GIORNI *et al.*, 2022).

De maneira geral, a saliva é constituída por 99% de água e 1% de eletrólito. Este 1% pode ser de origem inorgânica (cálcio, magnésio, sódio, potássio e entre outras) e de origem orgânica (proteínas, glicoproteínas, enzimas, imunoglobulinas e entre outras). A saliva também apresenta outros componentes, dentre eles, a uréia, células, glicose e microrganismos (HUMPHREY e WILLIAMSON, 2001; CARPENTER, 2013). Entretanto, a sua composição pode se alterar devido a vários fatores, como por exemplo, o ciclo circadiano (diante dos períodos do dia), a origem de sua produção por diferentes glândulas salivares, a idade, o fluxo salivar, a presença de doenças, fatores extrínsecos e intrínsecos, estilo de vida, entre outros (VIJAY *et al.*, 2015; LIN *et al.*, 2022).

A saliva apresenta várias funções, estando todas elas diretamente voltadas para a homeostase da cavidade oral. Especificamente, este fluido ajuda a formação de bolo alimentar, faz a defesa antimicrobiana (pela inibição do crescimento de algumas espécies bacterianas que podem causar a cárie dentária), favorece a limpeza e lubrificação dos tecidos bucais, é um

agente tamponante (principalmente pelos sistemas fosfato e bicarbonato, a fim de promover a neutralização do pH na presença de ácido), fornece íons cálcio e fosfato para a remineralização dos dentes e forma a película adquirida (PA) (HUMPHREY e WILLIAMSON, 2001; CARPENTER, 2013; BUZALAF *et al.*, 2012a).

1.2 Película adquirida

PA é uma camada orgânica (livre de bactérias) que se forma sobre toda a superfície que se encontra exposta à cavidade oral por meio da adsorção de proteínas (DAWES *et al.*, 1963). Especialmente, a maior parte desta película está sobre a superfície do esmalte dentário, desta forma é chamada de película adquirida do esmalte (PAE). As proteínas presentes na PAE são de origem predominantemente salivar, porém existe uma pequena quantidade de proteínas proveniente do fluido gengival, da dieta, de microrganismos e do epitélio bucal (SIQUEIRA *et al.*, 2012a). As proteínas se ligam à superfície do esmalte por vários mecanismos, dentre eles, as interações eletrostáticas, que ocorrem entre as macromoléculas e os íons cálcio e fosfato da apatita (HANNIG e JOINER, 2006). A PAE também contém outros componentes orgânicos, tais como, carboidratos, lipídios neutros, fosfolipídios e glicolipídios (SIQUEIRA *et al.*, 2012b).

Assim como a saliva, a PA também é influenciada por vários fatores, principalmente pelas propriedades físico-químicas da superfície onde ela é formada, ou seja, as diferentes superfícies (esmalte, dentina, mucosa e restaurações) podem alterar o seu perfil proteico (LENDENMANN *et al.*, 2000). Entretanto, este assunto é limitado devido à falta de estudos sobre a composição da PA nestas superfícies acima, dificultando a comparação destas películas com aquelas formadas sobre o esmalte, que são bem mais estudadas (RASPUTNIS *et al.*, 2021). Outro fator importante para a formação da PAE é a influência da sua localização dentro da cavidade oral. Isso foi evidenciado por um estudo *in vivo*, o qual demonstrou que a quantidade e a qualidade de proteína da PAE podem alterar dentro da cavidade oral, ou seja, a Cistatina B e a Histatina 1 não foram identificadas na região lingual posterior/inferior (VENTURA *et al.*, 2017). Também a PAE pode enfrentar a influência de fatores extrínsecos, dentre eles produtos odontológicos abrasivos (dentifrícios, clareadores, enxaguatórios) e a ingestão de alimentos e bebidas (HARA e ZERO, 2010). Interessantemente, um estudo *in situ* comparou a composição de proteínas da PAE formada em dentes bovinos e dentes humanos. Como resultado, não houve

diferenças significativas entre estas superfícies, propondo, então, que pode ser considerado o uso de dentes bovinos em protocolos de PAE (PELÁ *et al.*, 2018).

A formação da PAE acontece já no primeiro minuto de contato da saliva com a superfície do dente. Estudos demonstraram que neste curto tempo de formação, a PAE já fornece uma proteção para a superfície do esmalte dentário, principalmente frente a um desafio ácido. Esta característica está relacionada à presença das proteínas conhecidas como “precursoras”, as quais apresentam uma grande afinidade de ligação à hidroxiapatita e interagem eletrostaticamente com o esmalte, tornando a PAE altamente elétron densa. Como exemplos de proteínas precursoras, destacam-se: cistatinas, proteínas ricas em prolina (PRPs), lisozima, estaterina, histatinas, lactoferrina e a amilase (HANNIG *et al.*, 2004; SIQUEIRA *et al.*, 2012a; TRAUTMANN *et al.*, 2020; ARAÚJO *et al.* 2022). Posteriormente, a película se torna mais complexa, ou seja, ocorre a presença de agregados protéicos e interação entre as proteínas. As características deste estágio permanecem dinâmicas por um longo período (aproximadamente duas horas) (HANNIG e JOINER, 2006). A partir deste momento, a película adquirida altera a sua conformação por meio da presença abundante de bactérias e passa a ser nomeada, biofilme dentário (MARSH, 2004).

Todos os componentes presentes na PAE conferem importantes funções para a superfície onde ela está formada. A mucina é uma proteína desta camada orgânica com uma função relacionada à lubrificação da superfície (BUZALAF *et al.*, 2012a). Ela, juntamente com a cistatina, lisozima, estaterina e a histatina demonstram efeito ácido-resistente, protegendo a estrutura dentária contra a desmineralização ocasionada por efeitos químicos ou bacterianos (CHAWHUAVEANG *et al.*, 2021). Além disso, a PAE atua na remineralização, transportando cálcio, fluoreto e fosfato para a superfície dentária, também ela tem função de uma barreira de difusão, reduzindo o contato direto dos ácidos com a superfície do dente, retardando, assim, a dissolução de mineral (BUZALAF *et al.*, 2012a).

Desta forma, é possível observar que a composição da PAE pode ser útil como biomarcador de diagnóstico e/ou tratamento para determinadas doenças (BUZALAF *et al.*, 2020). Atualmente, as ferramentas proteômicas ganharam foco para a identificação de proteínas da PAE, a fim de melhor compreender suas determinadas funções e interações. Existem três tipos de protocolos para a análise proteômica da PAE: 1) Estudo *in vitro*, o qual está mais distante da condição clínica, devido às limitações do uso da saliva humana para mimetizar a formação da PAE fora da cavidade oral. Entretanto, é um importante protocolo para servir de

precursor para uma nova linha de pesquisa (SIQUEIRA *et al.*, 2012b); 2) Estudo *in situ*, o qual é caracterizado pelo uso de aparelho intraoral, contendo amostras onde irá formar a PAE mais próxima das condições reais da cavidade oral (PELÁ *et al.*, 2018; PELÁ *et al.*, 2019); 3) Estudo *in vivo*, no qual a PAE é estudada diretamente sobre a superfície exposta à cavidade oral (a maioria dos estudos é sobre o esmalte dentário) (VENTURA *et al.*, 2017). Em todos estes protocolos, o campo da odontologia está buscando compreender quais proteínas estão relacionadas às doenças bucais, como por exemplo, o desgaste dentário erosivo (DDE), a fim de que estas proteínas possam servir como futuras intervenções preventivas e/ou de tratamentos contra as doenças bucais.

1.3 Desgaste dentário erosivo

O DDE é a perda cumulativa do tecido dentário mineralizado, ocasionado pela presença de ácidos não bacterianos (SCHLUETER *et al.*, 2020). Um estudo demonstrou uma alta prevalência deste desgaste em crianças e adolescentes (SALAS *et al.*, 2015). Também, uma revisão de literatura mostrou que esta condição é prevalente entre mais de um terço das crianças abaixo de sete anos, sendo os fatores dietéticos os principais contribuintes para este problema (YIP *et al.*, 2022). Além disso, este desgaste é significativamente maior em pacientes com transtorno alimentares quando comparado aos indivíduos saudáveis (JOHANSSON *et al.*, 2012), bem como os indivíduos com uma dieta vegetariana (SMITS *et al.*, 2020) e em indivíduos que fazem o uso frequente de bebidas alcoólicas (DUKIC *et al.*, 2010). De maneira geral, o processo do DDE é progressivo, ou seja, caso não existam intervenções para inibi-lo, a sua prevalência e a sua severidade aumentam com o avanço da idade (JAEGGI e LUSSI, 2014). Assim, a busca por medidas que possam controlá-lo é de extrema importância.

Esta prevalência é devida a vários fatores, os quais podem ser divididos (didaticamente) em fatores extrínsecos e intrínsecos. Os principais fatores extrínsecos são: hábito alimentar do indivíduo, o qual envolve bebidas e alimentos ácidos, como por exemplo, refrigerantes e sucos de frutas cítricas. Os principais ácidos provenientes desta dieta são representados pelo ácido fosfórico e ácido cítrico, respectivamente (BARBOUR e LUSSI, 2014; SMITS *et al.*, 2020). Além disso, a presença frequente do indivíduo em determinados ambientes, como nadadores profissionais também podem sofrer este tipo de desgaste, devido a água tratada de piscinas olímpicas (SALEM e HAFEZ, 2021). Outra fonte externa de ácido pode ser representada por

alguns medicamentos efervescentes, como a vitamina C, a qual apresenta em sua composição o ácido ascórbico (SAADS CARVALHO e LUSSI, 2020).

Por outro lado, os fatores intrínsecos do DDE são caracterizados pela presença do ácido gástrico na cavidade bucal, sobretudo na superfície dentária. Esta ocorrência é devida a alguns problemas de saúde que o indivíduo pode apresentar, tais como, vômito, regurgitação ou refluxo gastroesofágico (PICOS *et al.*, 2020). Outros problemas intrínsecos, como por exemplo, úlceras duodenais, anorexia nervosa, bulimia ou náuseas durante a gravidez também podem ocasionar o DDE. Foi demonstrado que o principal causador intrínseco é o ácido clorídrico, o qual afeta as superfícies palatinas de incisivos e caninos superiores, resultando em perda da estrutura do esmalte (BARTLETT, 2006; MOAZZEZ e BARTLETT, 2014).

Ambos os fatores (extrínseco e intrínseco) são influenciados por algumas variações que estão diretamente ligadas ao DDE, como por exemplo, as variações do ácido (tipo de ácido, concentração, pK e o pH), as variações presentes na cavidade oral (capacidade tampão, presença de cálcio e proteínas), bem como fatores sociais (nível educacional, comportamento, condições de saúde e tipo de ocupação dos pacientes) (LUSSI e CARVALHO, 2014).

Com relação ao mecanismo de atuação do ácido sobre a estrutura dentária, é importante destacar duas características. A primeira está relacionada à capacidade que o ácido apresenta em liberar íons de hidrogênio (H^+), bem como a sua capacidade quelante (FEATHERSTONE e LUSSI, 2006). A segunda característica está relacionada à ausência de um “pH crítico”, ou seja, um pH específico do ácido para ocorrer a desmineralização (BARBOUR e LUSSI, 2014), diferente do que acontece no caso da cárie dentária. Para a erosão dentária, este processo ocorre quando a solução ácida está saturada em relação à superfície sólida, isso pode variar para o esmalte e para a dentina (BARBOUR e LUSSI, 2014). O processo erosivo no esmalte gera uma subsaturação da hidroxiapatita e fluorapatita, promovendo um amolecimento inicial da superfície dentária (BARBOUR e LUSSI, 2014). Podemos apresentar como este exemplo, o ácido cítrico, o qual fornece a liberação de três íons de H^+ em cada molécula por meio da sua dissociação em meio aquoso e, estes íons prontamente atuam sobre os íons cálcio e/ou fosfato (FEATHERSTONE e LUSSI, 2006). Se o processo persistir, irá ocorrer a dissolução contínua das camadas subsequentes dos cristais do esmalte, por meio da penetração do ácido na estrutura dentária e, conseqüentemente, a remoção dos íons Ca^{2+} e PO_4^{3-} , ocasionando a perda em volume da sua estrutura (WANG e LUSSI, 2010).

Em condições erosivas mais severas, o desgaste pode ultrapassar a camada de esmalte, chegando até a dentina. Neste tecido, o processo erosivo sofre algumas alterações devido à sua composição, ou seja, na dentina existe a presença de metaloproteinases da matriz, que podem degradar a matriz orgânica que foi desmineralizada. Entretanto, se esta matriz não for degradada, ela pode atuar como uma barreira de difusão iônica, retardando o avanço da erosão dentinária (BUZALAF *et al.*, 2012b).

Ao mencionar esta condição mais severa, também é importante lembrar que a erosão dentária pode estar associada a outro tipo de desgaste dentário, a abrasão (SHELLIS e ADDY, 2014). Este problema é caracterizado pela remoção mecânica da estrutura do dente ou de restaurações, principalmente pela escovação incorreta (SCHLUETER *et al.*, 2020). Alguns fatores podem potencializar a abrasão, como por exemplo, a força que o indivíduo aplica durante a escovação, bem como a frequência e o movimento de escovação, uma vez que foi observado que a causa da abrasão foi maior quando o movimento de escovação linear foi realizado, ao invés de movimentos rotativos (MILOSEVIC, 2017; SINGH *et al.*, 2021). Ainda, a dureza e a forma dos filamentos da escova também podem desencadear este desgaste (MILOSEVIC, 2017). Em concomitância, alguns produtos odontológicos apresentam efeitos abrasivos, principalmente dentifrícios, os quais estão focados para a ação clareadora do dente. Todos estes produtos podem apresentar em sua composição, componentes abrasivos, tais como, sílica hidratada, carbonato de cálcio e alumina (LIPPERT, 2013).

Para ambos os desgastes (erosão e abrasão) o principal sintoma é a sensibilidade para determinados alimentos e bebidas com temperaturas superiores ou inferiores em comparação à temperatura da cavidade oral. Também os sintomas podem ser estimulados por origem mecânica, por meio da higiene bucal com escovação e fio dental. Todos estes sintomas são devidos à exposição da dentina, a qual apresenta os túbulos dentinários abertos entre a cavidade oral e a polpa. Dentro destes túbulos, ocorre a movimentação do fluído intratubular, desencadeando uma estimulação na polpa e, conseqüentemente, o sintoma de dor (LUSSI e CARVALHO, 2014; LONGRIDGE e YOUNGSON, 2019). Entretanto, a odontologia (por meio de pesquisas científicas e procedimentos clínicos) tem demonstrado atenção contra estes agravamentos, a fim de preservar a saúde bucal.

1.4 Diagnósticos e medidas interventivas para o controle do desgaste dentário erosivo

Inicialmente, o diagnóstico acontece por meio de uma anamnese com o paciente, a fim de que se possa compreender o seu estilo de vida, sua alimentação e a presença de possíveis problemas de saúde que podem ter influenciado a causa da erosão dentária. Em seguida, o principal diagnóstico da erosão dentária é por meio da avaliação visual da morfologia anatômica do dente. O primeiro sinal do desgaste do esmalte é caracterizado por uma superfície com aspecto lisa e, na maioria das vezes, sem brilho (opaco). Geralmente, estas lesões estão presentes na junção entre o esmalte e o cimento, mas estes sinais clínicos também podem ser observados nas superfícies oclusais (WANG e LUSSI, 2010; DONOVAN *et al.*, 2021). Em estágios mais avançados, a superfície pode apresentar aspectos mais polidos e uma alteração do contorno morfológico do dente. Esta alteração é devida à perda da estrutura dentária, como por exemplo, o esmalte, resultando na exposição da estrutura dentinária (GANSS *et al.*, 2006).

Além disso, a avaliação da erosão dentária é fundamental para a inserção de medida preventiva e/ou de intervenção odontológica, como por exemplo, a restauração do dente (WANG e LUSSI, 2010). Existem alguns índices para classificar o desgaste erosivo, um dos mais utilizados é o BEWE (Basic Erosive Wear Examination), o qual é recomendado para o diagnóstico, acompanhamento e a escolha da intervenção no paciente (BARTLETT *et al.*, 2008). Este método de classificação é baseado em quatro critérios: 1) Sem desgaste erosivo dos dentes; 2) Perda da textura inicial da superfície; 3) Perda do tecido duro menor que 50% da área de superfície; e 4) perda de tecido duro maior que 50% da área de superfície. Nestes dois últimos critérios, a dentina é frequentemente exposta (BARTLETT *et al.*, 2008). Também o uso da tecnologia permitiu desenvolver alguns equipamentos ópticos capazes de quantificar a perda do tecido dentário. Entretanto, o uso destes equipamentos em pacientes com sinais de erosão dentária é limitado, devido à falta da sua disponibilidade em clínicas odontológicas (RAKHMATULLINA *et al.*, 2013; TSAI *et al.*, 2019).

Para que o DDE possa ser controlado, inúmeros estudos estão sendo realizados, utilizando abordagens distintas, ou seja, empregando vários veículos de aplicação, tais como, solução, géis e vernizes, contendo diferentes princípios ativos (SANTOS *et al.*, 2021; ALENCAR *et al.*, 2022). De maneira geral, os estudos estão baseados na busca por componentes que possam ser eficazes. Dentre os componentes inorgânicos, o fluoreto de sódio e o estanho estão sendo o alvo de escolha para o desenvolvimento de tratamentos contra o DDE. Este foco é devido aos seus mecanismos de proteção, os quais reagem com a hidroxiapatita,

diminuindo a solubilidade do esmalte e, conseqüentemente, protegendo contra a desmineralização (ALGARNI *et al.*, 2015). Devido à está grande eficácia, um produto contendo estes componentes está comercialmente disponível para a população (Elmex[®] - erosion protection), sendo considerado “padrão ouro” em pesquisas científicas contra o DDE (HUYSMANS *et al.*, 2014). Além disso, existem outros compostos que têm demonstrado eficácia para o controle do DDE, dentre eles, o tetrafluoreto de titânio (LINS *et al.*, 2022) e silicato de cálcio (VICENTE *et al.*, 2021).

Neste mesmo caminho contra o DDE, existem inúmeros componentes orgânicos extrínsecos, os quais estão avaliados nesta área de atuação. Especificamente, os polifenóis (provenientes de diferentes fontes, como por exemplo, alimentos e plantas) têm demonstrado bons resultados contra a erosão dentária (FLEMMING *et al.*, 2021). Neste mesmo contexto, os polifenóis derivados do chá verde (*epigallocatechin-gallate*) merecem destaque para o seu efeito protetor contra a erosão, sobretudo para a dentina. O seu mecanismo de proteção ocorre por meio da inibição das metaloproteinases da matriz (BUZALAF *et al.*, 2012b). Além disso, extratos naturais (de cravo e da casca de cajueiro) apresentaram efeito protetor sobre a estrutura dentária, sugerindo-os como novos candidatos para a terapia contra o DDE (SILVEIRA *et al.*, 2014; SARIALIOGLU GUNGOR e DONMEZ, 2021).

Também foram estabelecidas algumas abordagens para a prevenção do DDE, usando Vitamina E oleosa, a qual obteve o mesmo nível de proteção quando comparada ao grupo da solução comercial (Elmex[®] - erosion protection) (RIOS *et al.*, 2021). Além disso, outros tratamentos à base de óleo também foram testados e apresentaram propriedades protetoras, tais como o óleo de coco, girassol e de palma (IONTA *et al.*, 2017; IONTA *et al.*, 2018).

Com relação aos tratamentos envolvendo proteínas contra a erosão dentária, um estudo *in situ* demonstrou resultados promissores quando a caseína foi usada como tratamento (YE *et al.*, 2018). Também outro estudo usou esta proteína na suplementação do suco de laranja (*in vitro*) para proteção da erosão dentária (FERREIRA *et al.*, 2015). Em adição, o uso da mucina em saliva artificial (para protocolo *in vitro*) resultou um efeito protetor semelhante ao grupo de saliva humana (sem a adição externa de mucina) (JORDÃO *et al.*, 2017).

Além destes componentes usados de forma isolada, a aplicação de diferentes combinações está sendo altamente recomendada, a fim de potencializar a capacidade protetora contra o DDE. É possível encontrar estudos com a associação entre componentes inorgânicos (estanho e fluoreto) (ALGARNI *et al.*, 2015); também entre componentes orgânicos (mucina e

caseína) (CHEAIB e LUSSI, 2011) e entre extratos de plantas (WEBER *et al.*, 2015). Especialmente, para a combinação entre componentes orgânicos e inorgânicos, a literatura apresenta bons resultados envolvendo a combinação de caseína e fluoreto para a superfície do esmalte (LENNON *et al.*, 2006) e a combinação de colágeno e fluoreto para a estrutura dentinária (NAHÓRNY *et al.*, 2022).

Como descrito acima, diferentes componentes foram utilizados para o controle do DDE. Além disso, existem vários protocolos de aplicação sobre a superfície dentária, alguns foram utilizados na forma de tratamento (após um desgaste erosivo) (DE SOUZA *et al.*, 2018) e outros foram usados como forma de prevenção (antes do desgaste erosivo e da formação da PAE) (IONTA *et al.*, 2018).

1.5 Engenharia de película adquirida

A aplicação do tratamento antes da formação da PAE abriu uma nova vertente para o campo da prevenção do DDE. O primeiro estudo usando este contexto envolveu a aplicação da mucina e da caseína antes da formação da PAE para a proteção da erosão dentária (CHEAIB e LUSSI, 2011). Posteriormente, os mesmos tratamentos foram utilizados para demonstrar o impacto da modificação da PAE e sua influência sobre a adesão inicial das bactérias colonizadoras. Como resultado, os tratamentos diminuíram a quantidade de bactérias aderidas à superfície do esmalte (CHEAIB *et al.*, 2015). Em adição, outros estudos foram realizados por meio da modificação desta camada orgânica, utilizando diferentes tratamentos, tais como, polifenóis (NIEMEYER *et al.*, 2021) e leite (NEKRASHEVYCH *et al.*, 2021).

Por este caminho, nosso grupo de pesquisa também destinou atenção para este procedimento. Desta forma, um estudo *in vitro* utilizou tratamentos protéicos (mucina, caseína, cistatina-B e uma cistatina derivada da cana-de-açúcar (CaneCPI-5)) antes e após a formação da PAE, seguido pelo desafio erosivo com ácido cítrico para simular a erosão extrínseca. Os resultados demonstraram uma melhor eficácia quando o tratamento da CaneCPI-5 foi aplicado antes da formação da PAE (SANTIAGO *et al.*, 2017). Em adição, outras proteínas foram estudadas por meio desta sequência de aplicação, como por exemplo, a hemoglobina e um peptídeo de estaterina, os quais foram inclusos como tratamento e demonstraram proteção contra a erosão dentária inicial, utilizando o ácido clorídrico para simular a erosão intrínseca na superfície do esmalte dentário (MARTINI *et al.*, 2020; TAIRA *et al.*, 2020).

Diante destes resultados promissores, nosso grupo de pesquisa nomeou com exclusividade esta sequência de aplicação (tratamento, formação da PAE e desafio erosivo) com o seguinte termo: “Engenharia de película adquirida”, o qual objetiva fortalecer a PAE por meio do tratamento prévio com proteínas, a fim de favorecer a proteção contra a erosão dentária e o DDE (CARVALHO *et al.*, 2020). O primeiro estudo utilizando este termo foi realizado *in vivo* com a aplicação prévia (na forma de bochecho) com diferentes tratamentos (CaneCPI-5, hemoglobina, peptídeo de estaterina e a combinação de todos eles) durante um minuto, seguido pela formação da PAE (durante 2 horas) e pelo desafio erosivo com ácido cítrico. A PAE foi coletada e o perfil proteômico foi revelado por espectrometria de massas. Como resultado, foi identificada uma alteração vantajosa no perfil proteico da PAE, aumentando a expressão de proteínas consideradas ácido-resistentes na película, tais como a cistatina, lisozima e proteína S100-A9 (CARVALHO *et al.*, 2020). Posteriormente, foi realizado um estudo semelhante ao anterior, entretanto a PAE foi analisada após 3 minutos de formação (sem a presença do desafio erosivo), a fim de verificar as ligações das proteínas precursoras sobre o esmalte dentário. Então, os resultados demonstraram que os tratamentos (CaneCPI-5, hemoglobina, peptídeo de estaterina e a combinação de todos eles) também influenciaram no aumento da expressão de importantes proteínas consideradas ácido-resistentes na PAE (ARAÚJO *et al.*, 2022).

Dentre os tratamentos protéicos mencionados, a CaneCPI-5 merece destaque, devido ao seu efeito protetor sobre a superfície do esmalte, consequência de sua alta força de ligação ao esmalte, bem como às suas características científicas e tecnológicas (SANTIAGO *et al.*, 2017).

1.6 Cistatina derivada da cana-de-açúcar (CaneCPI-5)

O desenvolvimento da CaneCPI-5 contra a erosão dentária teve início com dois estudos proteômicos de PAE. No primeiro estudo, a PA foi formada sobre a superfície da dentina em um protocolo *in situ* (DELECRODE *et al.*, 2015a). Já no outro, a PAE foi formada em um protocolo *in vivo* (DELECRODE *et al.*, 2015b). Em ambos os estudos, os desafios erosivos foram realizados com ácido cítrico (simulando a erosão dentária extrínseca) e com ácido láctico (simulando um processo cariioso). Após estes desafios, a PAE foi coletada e processada para a análise proteômica. O destaque dos resultados (para ambos os estudos) foi a identificação da mucina e da cistatina-B como proteínas ácido-resistentes para o ácido láctico e o ácido cítrico, respectivamente. (DELECRODE *et al.*, 2015a; DELECRODE *et al.*, 2015b). Em adição, a expressão da cistatina-B demonstrou estar mais aumentada após os desafios erosivos com os

ácidos cítrico (20 vezes) e láctico (13 vezes) sobre a superfície do esmalte dentário *in vivo*, em comparação ao controle (água deionizada), ressaltando o caráter ácido-resistente desta proteína. Assim, ambos os estudos (*in situ* e *in vivo*) sugerem o desenvolvimento de futuros produtos odontológicos contendo estas proteínas para atuarem contra os desgastes dentários. Em especial, a cistatina para o DDE.

Entretanto, a aquisição da cistatina-B tornou-se uma preocupação, por causa do seu alto custo, principalmente ao pensar sobre a sua inserção para o desenvolvimento de produtos comerciais. Diante desta limitação, foi desenvolvida (recombinantemente) a CaneCPI-5 (SANTIAGO *et al.*, 2017). Esta proteína demonstrou características vantajosas em comparação às cistatinas descobertas anteriormente (CaneCPI-1 a CaneCPI-4), principalmente em relação a sua atividade inibitória contra cisteíno-peptidases (catepsinas B e L), as quais apresentam resistência à inibição por cistatinas (SHIBAO *et al.*, 2021). A CaneCPI-5 também demonstrou um baixo custo de produção, bem como ser mais solúvel sob a produção de um sistema de expressão bacteriano (*Escherichia coli*), o que facilita a sua produção e purificação em maiores escalas (SHIBAO *et al.*, 2021). Além disso, esta proteína apresentou uma alta força de ligação ao esmalte, em experimentos envolvendo microscopia de força atômica (SANTIAGO *et al.*, 2017). Estas características desejáveis chamaram a nossa atenção como uma excelente candidata para o desenvolvimento de produtos odontológicos, visando à prevenção do DDE.

Diante disso, foram iniciados os estudos envolvendo a CaneCPI-5 na área da Odontologia, principalmente para o foco na proteção do DDE e da cárie dentária. Em relação a esta, a CaneCPI-5 demonstrou eficácia para os protocolos de biofilme dentário *in vitro*, resultando na diminuição da viabilidade do biofilme bacteriano, bem como no processo de desmineralização do esmalte (PELÁ *et al.*, 2021c; ARAÚJO *et al.*, 2021).

Especialmente para a erosão dentária, a CaneCPI-5 demonstrou proteção contra a erosão inicial do esmalte (usando ácido cítrico) sob um protocolo *in vitro* (SANTIAGO *et al.*, 2017). Posteriormente, um estudo demonstrou que o enxaguatório contendo CaneCPI-5 *in vivo* foi capaz de diminuir a liberação de cálcio presente no ácido cítrico utilizado durante o desafio erosivo, por meio da técnica de biópsia sobre a superfície do esmalte dentário (CARVALHO *et al.*, 2020). Mais recentemente, um estudo de erosão prolongada (*in vitro*) mostrou o efeito protetor da CaneCPI-5 em diferentes veículos (solução e gel) sobre amostras de esmalte e dentina. Neste estudo foi observado que a CaneCPI-5 na concentração de 0,1 mg/mL é eficaz para o esmalte quando usado em ambos os veículos; entretanto, é necessário aumentar a sua

concentração (0,25 mg/mL) quando o gel é aplicado sobre a superfície da dentina (SANTOS *et al.*, 2021).

Diante do exposto, a CaneCPI-5 tem demonstrado proteção para a cárie, erosão dentária inicial e para o DDE quando utilizada em estratégias envolvendo a engenharia de película adquirida. Entretanto é importante testar novas alternativas para verificar a sua capacidade protetora sobre o esmalte dentário.

1.7 Estratégias para o desenvolvimento de produtos odontológicos com CaneCPI-5

Para que novos produtos odontológicos contendo a CaneCPI-5 sejam desenvolvidos comercialmente, é fundamental criar novas estratégias do uso desta proteína, a fim de estabelecer o seu melhor efeito protetor contra o DDE.

Para isso, inicialmente será importante compreender e comparar o perfil proteico da PAE em diferentes protocolos (*in vitro*, *in situ* e *in vivo*). Esta comparação será útil para a extrapolação dos resultados obtidos em protocolos laboratoriais em comparação a condição clínica, uma vez que a PAE está intimamente associada ao erosão dentária por meio da engenharia de película adquirida com CaneCPI-5.

Além disso, o campo de pesquisa envolvendo erosão dentária e DDE requer uma sequência de execução de protocolos, ou seja, o protocolo *in vitro* é o primeiro a ser realizado, seguido pelo protocolo *in situ* e, por último, o *in vivo*. Ainda neste contexto, é fundamental encontrar um equipamento que possa ser utilizado para avaliar a erosão dentária inicial e o DDE em todos os protocolos mencionados acima. Também existe a necessidade de compreender o mecanismo de ação da CaneCPI-5 na superfície do esmalte dentário, bem como testar esta proteína usando diferentes combinações com componentes orgânicos (peptídeo de estaterina, hemoglobina) ou componentes inorgânicos (fluoreto de sódio).

Posteriormente, a segurança da CaneCPI-5 em células da cavidade oral merece ser verificada para uma futura aplicação clínica, além de desenvolver protocolos *in situ* com desafios erosivos mais severos e até mesmo em associação aos desafios abrasivos. Em adição, é fundamental que a CaneCPI-5 seja testada em diferentes veículos de aplicação, como por exemplo, enxaguatórios ou géis de aplicação tópica. Por fim, espera-se verificar o efeito protetor da CaneCPI-5 em uma real situação clínica (*in vivo*) contra a erosão dentária, para que

este resultado possa servir como prova de conceito dos resultados obtidos em condições laboratoriais (*in vitro*) e, principalmente, para o direcionamento de novos produtos.

Portanto, esta tese apresenta uma pesquisa translacional (do *in vitro* ao *in vivo*), usando as estratégias propostas acima com a CaneCPI-5, a fim de permitir um grande avanço para o *design* de novos produtos odontológicos contra o DDE do esmalte.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo desta tese é desenvolver novas estratégias empregando a CaneCPI-5 (em diferentes protocolos, combinações e veículos) por meio da engenharia de película adquirida contra a erosão dentária e o DDE do esmalte.

2.2 Objetivos específicos

Esta tese apresenta sete capítulos, os quais foram desenvolvidos separadamente com os seguintes objetivos específicos:

Capítulo 1: Padronizar a formação da PAE, bem como testar diferentes soluções para a sua coleta *in vitro*, usando ácido cítrico 3%, dodecil sulfato de sódio 0,5% e duas sequências de combinações destas soluções.

Capítulo 2: Comparar o perfil proteico da PAE formada em diferentes protocolos experimentais *in vitro*, *in situ* e *in vivo* por meio da análise proteômica (LC-ESI-MS/MS).

Capítulo 3: Avaliar o efeito protetor das proteínas/peptídeos (CaneCPI-5, hemoglobina e o peptídeo de estaterina, isoladamente ou em combinação) contra a erosão dentária inicial *in vitro*, bem como elucidar o mecanismo de ação destes tratamentos quando aplicados diretamente na superfície do esmalte nativo ou por meio da engenharia de película adquirida.

Capítulo 4: Desenvolver uma combinação contendo CaneCPI-5 e fluoreto de sódio adicionado a uma solução antes da formação da PAE para a prevenção da erosão dentária inicial *in vitro*.

Capítulo 5: Analisar a citotoxicidade da CaneCPI-5 em cultura de fibroblastos gengivais humanos, bem como verificar o potencial protetor da modificação da PAE com uma solução contendo a CaneCPI-5 contra a erosão e a erosão associada a abrasão *in situ*.

Capítulo 6: Avaliar o efeito preventivo de um gel de quitosana contendo CaneCPI-5 contra a erosão e a erosão associada a abrasão do esmalte *in situ*, por meio de procedimento de engenharia de película adquirida.

Capítulo 7: Utilizar clinicamente um método de análise (Reflectômetro Optipen) para avaliar o efeito preventivo da engenharia de película adquirida com uma solução de bochecho contendo CaneCPI-5 contra a erosão inicial do esmalte *in vivo*.

A decorative flourish consisting of a thin, dark line that forms a large, elegant loop on the left side, a smaller loop on the right side, and a long, sweeping tail that connects the two loops and extends towards the right edge of the page.

3. **C** APÍTULO 1

**PADRONIZAÇÃO DA FORMAÇÃO E COLETA DA PELÍCULA ADQUIRIDA DO
ESMALTE *IN VITRO* PARA A IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS POR
ESPECTROMETRIA DE MASSA**

3.1 INTRODUÇÃO

Este primeiro capítulo foi baseado em um artigo científico publicado no ano de 2020 no *Journal of Applied Oral Science*. O estudo está intitulado “Optimizing the formation of the acquired enamel pellicle *in vitro* for proteomic analysis”. A autoria está representada pela seguinte ordem: Vinícius Taioqui Pelá, Talita Mendes Oliveira Ventura e Marília Afonso Rabelo Buzalaf (Ver a página inicial do artigo em APÊNDICE 1).

Desta forma, a tese inicia com as principais considerações deste estudo (de forma resumida) devido a sua grande relevância para a compreensão do perfil protéico da PAE *in vitro*. Além disso, os resultados deste estudo servirão como base científica para o próximo capítulo, que está apresentado na sequência. Desta forma, um dos principais focos do presente capítulo é demonstrar a dificuldade e, posteriormente a solução para formar e coletar a PAE *in vitro* para a análise proteômica. Esta limitação está relacionada principalmente à ausência do fluxo salivar (de forma contínua) na condição *in vitro*. Por este motivo, a maioria dos estudos proteômicos de PAE estão direcionados para os protocolos mais próximos da condição clínica, como por exemplo, *in situ* e *in vivo*, os quais apresentam o fluxo salivar constante na cavidade oral, favorecendo a identificação de proteínas por análise proteômica (VENTURA *et al.*, 2017).

A maioria dos estudos *in vivo* da PAE emprega três características metodológicas, tais como o uso do papel filtro de eletrodo umedecido em ácido cítrico 3% (AC) para a coleta da PAE; a quantidade entre 8 a 10 participantes no estudo; e o agrupamento das amostras contendo as proteínas coletadas (em forma de *pool*), a fim de se obter uma quantidade suficiente para ser analisada por espectrometria de massa (SIQUEIRA *et al.*, 2007; LEE *et al.*, 2013; ZIMMERMAN *et al.*, 2013; VENTURA *et al.*, 2017; TAIRA *et al.*, 2018; CASSIANO *et al.*, 2018; MARTINI *et al.*, 2019). Por outro lado, um estudo empregou uma técnica diferenciada de coleta da PAE *in vivo*, usando dodecil sulfato de sódio 0,5% (SDS) para a identificação de proteínas individuais por análise de immunoblotting (MUTAHAR *et al.*, 2017).

Com relação aos protocolos *in situ*, a técnica mais comum de coleta da PAE é por meio do ácido cítrico (DELECRODE *et al.*, 2015a; DELIUS *et al.*, 2017; PELÁ *et al.*, 2018; PELÁ *et al.*, 2019). Porém, este protocolo é mais difícil de executar devido ao preparo de uma grande quantidade de espécimes (humanos, bovinos, cerâmicos ou outras formulações), bem como a presença de participantes que se disponham a usar aparelhos intraorais (palatinos ou mandibulares) por períodos mais longos (DELECRODE *et al.*, 2015a; DELIUS *et al.*, 2017; PELÁ *et al.*, 2018; PELÁ *et al.*, 2019).

Ainda neste contexto, um estudo inovou na coleta da PA em espécimes cerâmicos *in situ*, realizando a análise individual (de identificação de proteínas) para cada participante. Para tal, a película foi coletada por incubação dos espécimes em tampão Tris-HCl, contendo Triton X-100, seguida por uma incubação adicional em tampão RIPA (DELIUS *et al.*, 2017). Entretanto, este protocolo de coleta não é viável para ser empregado em estudos *in vivo*, uma vez que os componentes utilizados (dentre eles, Triton X-100) são considerados altamente tóxicos para as células da cavidade oral (SONG *et al.*, 2017). Também, o uso deste protocolo clinicamente se torna impossível devido à realização do procedimento de sonicação em amostras *in vivo*.

Para os estudos de coleta da PAE *in vitro*, existe uma grande limitação na quantidade de trabalhos publicados. Apenas um estudo foi realizado nesta condição, o qual utilizou o ácido cítrico para a coleta da PAE e demonstrou uma redução do número de proteínas identificadas (apenas 45 proteínas) (SIQUEIRA *et al.*, 2012b), em comparação com as demais condições (*in situ* e *in vivo*) (DELECRODE *et al.*, 2015a; VENTURA *et al.*, 2017). Todas estas considerações sobre a dificuldade de se formar e coletar a PAE *in vitro* foram levadas em consideração no presente estudo.

3.2 OBJETIVO

O objetivo deste capítulo foi padronizar a formação da PAE (por meio da troca de saliva humana), bem como testar diferentes soluções de coleta *in vitro*, usando AC (SIQUEIRA *et al.*, 2007) e SDS (MUTAHAR *et al.*, 2017). Além disso, foram realizadas duas combinações das soluções citadas acima, sendo: AC seguido de SDS (AC+SDS) e SDS seguido de AC (SDS+AC) (Figura 1).

3.3 HIPÓTESE NULA

As hipóteses nula foram: 1) a troca de saliva não favorece a formação da PAE; 2) as diferentes soluções de coleta da PAE não diferem entre si para a análise proteômica.

3.4 MATERIAL E MÉTODOS

Resumidamente, 432 espécimes de esmalte bovino foram preparados (4x4 mm) e divididos em quatro grupos (n=108). A saliva não estimulada foi fornecida por nove participantes. A nova técnica de formação de PAE foi baseada na troca de saliva por uma nova a cada 30 min, dentro de 2 h, a 37 °C, sob agitação. PAE foi coletada, usando um papel de filtro

de eletrodo (embebido nas soluções de coleta) de acordo com os seguintes grupos: 1) ácido cítrico a 3% (AC); 2) dodecil sulfato de sódio a 0,5% (SDS); 3) AC seguido de SDS (AC+SDS); 4) SDS seguido por AC (SDS+CA). As películas coletadas foram processadas para análise proteômica (VENTURA *et al.*, 2017). Para mais detalhes da metodologia, ver APÊNDICE 1. Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Humano e Animal (86772718.0.0000.5417 e 007/2018, respectivamente) da Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, SP, Brasil (CAAE 86774018.6.0000.5417) (ver ANEXO 1).

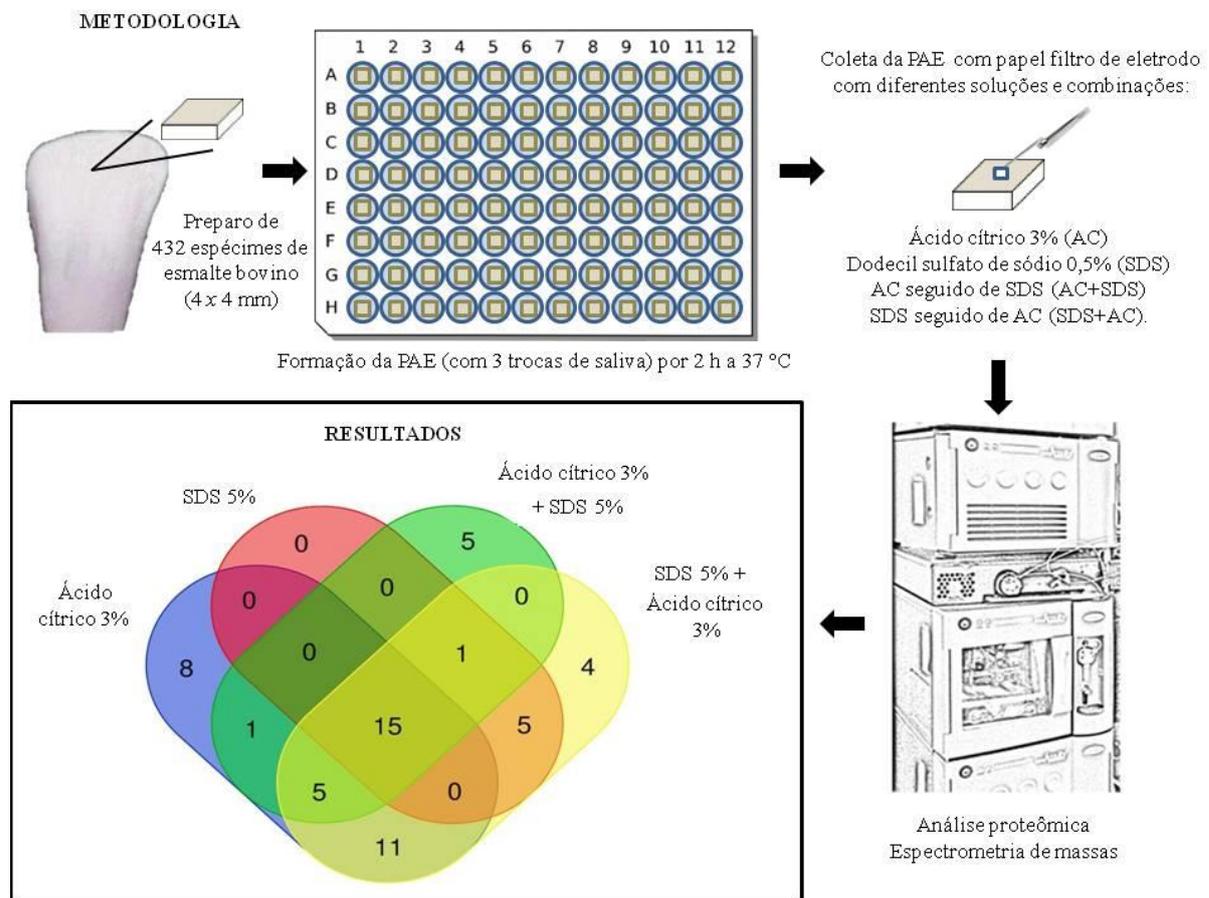


Figura 1. Resumo do esquema metodológico *in vitro* e diagrama de Venn. Demonstração do preparo dos espécimes de esmalte bovino, a formação e a coleta da PAE (com diferentes soluções e combinações) para a análise proteômica. Posteriormente, o diagrama de Venn representa o resultado do número de proteínas para cada grupo, bem como as comparações entre eles.

3.5 PRINCIPAIS RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da comparação entre as diferentes soluções e combinações demonstraram que houve uma semelhança (entre os grupos) na quantidade total de proteínas identificadas

(variando em 26 e 33 μg). Estes valores são considerados satisfatórios, principalmente por se tratar de um estudo *in vitro*. Além disso, a maioria destas proteínas é tipicamente encontrada na PAE, com importantes funções para a superfície do esmalte dentário (Tabela 1).

Os números totais de proteínas identificadas em cada grupo foram 40, 21, 27 e 41 para AC, SDS, AC+SDS e SDS+AC, respectivamente. Além disso, os números de proteínas encontradas exclusivamente em um dos grupos foram 8, 0, 5 e 4 para os grupos AC, SDS, AC+SDS e SDS+AC, respectivamente (Figura 1; Tabela 1).

Quinze proteínas foram identificadas em todos os grupos, sendo a maioria proteínas tipicamente descritas na PAE, como isoformas de alfa-amilase, isoformas de cistatina, lisozima e estaterina. Entretanto, algumas proteínas foram exclusivas para cada grupo, como por exemplo, a mucina que foi identificada apenas nos grupos AC e AC+SDS, enquanto que a proteína S100-A9 foi encontrada apenas nos grupos AC e SDS+AC. Além disso, isoformas de hemoglobina foram detectadas apenas nos grupos SDS e SDS+AC. Entretanto, uma proteína típica da estrutura do esmalte, chamada enamelina, foi identificada apenas no grupo AC+SDS. Por fim, algumas proteínas ricas em prolinas (PRPs) não foram encontradas no grupo SDS (Tabela 1).

Diante destes resultados, algumas observações foram levantadas. Inicialmente é importante mencionar que o protocolo envolvendo Triton X-100 e tampão RIPA (DELIUS *et al.*, 2017) não apresentou interesse para ser empregado no presente estudo devido às limitações que o mesmo apresenta na condição *in vivo*. Por outro lado, o protocolo realizado com SDS *in vivo* foi utilizado nesta comparação, uma vez que o mesmo ainda não havia sido testado para a análise da PAE por espectrometria de massas (MUTAHAR *et al.*, 2017).

O presente estudo trouxe uma inovação para superar a dificuldade de formar e coletar a PAE, ou seja, a troca de saliva dos espécimes a cada 30 min, durante o período de formação da PAE por duas horas. Esta novidade foi bem aceita para um estudo *in vitro*, pois permitiu a recuperação de aproximadamente 30 μg de proteínas, quantidade que foi suficiente para a análise proteômica.

Além da troca da saliva, as diferentes soluções utilizadas para coletar a PAE também influenciaram na quantidade e na qualidade de proteínas recuperadas para a análise proteômica. No presente estudo, foram utilizadas duas soluções: AC e SDS, isoladamente ou em

combinação. O uso destas diferentes soluções de coleta também foi importante para certificar qual o melhor método de coleta para os próximos estudos.

Um aspecto importante na área de proteômica de PAE é considerar a qualidade das proteínas identificadas. Todas as proteínas (do presente estudo) foram classificadas de acordo com a sua função, localização e interação (RISON *et al.*, 2000; ZIMMERMAN *et al.*, 2013). Diante disso, a mucina é considerada uma proteína de alta relevância na PAE, por ser uma proteína precursora (SIQUEIRA *et al.*, 2012b). Ela também está associada ao processo de lubrificação (HANNIG e JOINER, 2006) e à proteção contra desafios erosivos (JORDÃO *et al.*, 2017). Curiosamente, a mucina foi identificada apenas nos grupos AC e AC+SDS. Isso significa que o uso de SDS antes do AC não remove essa proteína, impossibilitando a sua identificação em análises posteriores. Outro achado significativo foi a enamelinina (proteína típica da estrutura do esmalte dentário), que esteve presente apenas no grupo AC+SDS (Tabela 1), ou seja, a combinação destas soluções pode ser agressiva à superfície do esmalte, tornando inviável o seu uso para a coleta da PAE na condição clínica.

Tabela 1. Classificação das proteínas da PAE *in vitro*. Proteínas presentes em cada grupo.

Número de acesso	Nome da proteína	Score	A C	SD S	AC + SD S	SD S + AC
P68032	Actin_ alpha cardiac muscle 1 (d, m, n, q, u, w)	65.6055	x			x
P68133	Actin_ alpha skeletal muscle (b, d, m, n, q, u, w)	65.6055	x			x
P62736	Actin_ aortic smooth muscle (b, d, m, n, q, u)	65.6055	x			x
P60709	Actin_ cytoplasmic 1 (b, m, n, q, u, w)	65.6055	x			x
P63261	Actin_ cytoplasmic 2 (a, d, g, j, n, q, u, w)	65.6055	x			x
P63267	Actin_ gamma-enteric smooth muscle (b, m, n, q, u, w)	65.6055	x			x
P04745	Alpha-amylase 1 (a, g, o, u)	452.445 5	x	x	x	x

P19961	Alpha-amylase 2B ^(a, g, o, u)	579.391 2	x	x	x	x
G5E9X6	Basic salivary proline-rich protein 1 ^(b, l, o, u)	155.862 3	x		x	x
P02812	Basic salivary proline-rich protein 2 ^(b, l, o, u)	155.862 3	x		x	x
Q562R1	Beta-actin-like protein 2 ^(b, m, n, u, w)	78.1257	x			x
Q96RL1	BRCA1-A complex subunit RAP80 ^(d, m, p, u)	47.3122	x			
P38398	Breast cancer type 1 susceptibility protein ^(b, e, m, n, p, u)	85.8217	x			
Q8N4G4	CA6 protein ^(a,m,t,u)	76.7328		x	x	x
P23280	Carbonic anhydrase 6 ^(a, g, o, u)	301.665 7	x	x	x	x
Q9BXL7	Caspase recruitment domain-containing protein 11 ^(c, e, m, n, s, w)	60.8839	x			
P08603	Complement factor H ^(b, m, o, u)	38.0628			x	
Q03591	Complement factor H-related protein 1 ^(a, m, o, w)	38.0628			x	
P01036	Cystatin-S ^(a, b, g, o, u)	2640.73 3	x	x	x	x
P09228	Cystatin-SA ^(a, b, g, o, u)	451.485 7	x	x	x	x
P01037	Cystatin-SN ^(a, b, g, o, u)	2646.62 4	x	x	x	x
Q9UGM3	Deleted in malignant brain tumors 1 protein ^(f, m, n, o, v, w)	86.0094	x	x	x	x
O75928	E3 SUMO-protein ligase PIAS2 ^(e, m, p, u)	24.2121			x	
Q9NRM1	Enamelin ^(b, d, m, o, w)	15.9628			x	
P68871	Hemoglobin subunit beta ^(b, c, m, n, o, u, w)	293.959 4		x		x

P02042	Hemoglobin subunit delta ^(b, c, m, n, o, u, w)	293.959 4		x		x
P02100	Hemoglobin subunit epsilon ^(b, c, m, n, u)	293.959 4		x		x
P69891	Hemoglobin subunit gamma-1 ^(b, c, h, n, o, u, w)	293.959 4		x		x
P69892	Hemoglobin subunit gamma-2 ^(b, c, m, n, u)	293.959 4		x		x
P01876	Immunoglobulin heavy constant alpha 1 ^(b, e, i, j, o, u)	866.754 2	x	x	x	x
P01877	Immunoglobulin heavy constant alpha 2 ^(b, e, i, j, o, u)	806.516 5	x	x	x	x
P01591	Immunoglobulin J chain ^(a, b, m, o, w)	946.053 7				x
Q8WYH8	Inhibitor of growth protein 5 ^(b, m, p, u)	95.4649			x	
Q9H1B7	Interferon regulatory factor 2-binding protein-like ^(b, m, p, u)	9.3029				x
P31025	Lipocalin-1 ^(a, b, m, o, w)	623.590 7	x	x	x	x
P61626	Lysozyme C ^(a, b, g, i, j, o, u, w)	268.284 4	x	x	x	x
Q8TAX7	Mucin-7 ^(b, i, k, o, u)	417.139 9	x		x	
C9JTN7	Nucleolysin TIA-1 isoform p40 ^(b,m,n,x)	92.8821	x			
P04746	Pancreatic alpha-amylase ^(a, g, o, u)	1996.41 7	x	x	x	x
Q6S8J3	POTE ankyrin domain family member E ^(b, m, o, u)	65.6055	x			x
A5A3E0	POTE ankyrin domain family member F ^(b, m, o, u)	65.6055	x			x
P0CG38	POTE ankyrin domain family member I ^(b, m, o, u)	69.466				x

P0CG39	POTE ankyrin domain family member J (b, m, o, u)	69.466				X
A0A0A0MT3 1	Proline-rich protein 4 (b, l, p, u)	420.909 6	X		X	X
P06702	Protein S100-A9 (a, b, g, i, j, n, o, q, s, u, w)	711.966 7	X			X
Q9BYX7	Putative beta-actin-like protein 3 (a, m, n, q, u, w)	65.6055	X			X
Q5VSP4	Putative lipocalin 1-like protein 1 (b, m, o, x)	204.544 4	X	X	X	X
P02810	Salivary acidic proline-rich phosphoprotein 1/2 (b, d, h, l, o, u, v)	420.909 6	X		X	X
Q8NBW4	Sodium-coupled neutral amino acid transporter 9 (f, m, r, u, w)	255.082 3	X			
Q86WA9	Sodium-independent sulfate anion transporter (c, m, s, u)	262.134 5	X			
P02808	Statherin (b, e, i, l, o, u)	54090.5 2	X	X	X	X
P02814	Submaxillary gland androgen-regulated protein 3B (a, g, o, u, w)	3959.27 6	X	X	X	X
P17987	T-complex protein 1 subunit alpha (e, m, n, w)	59.5312	X			
A0A087WZY 1	Uncharacterized protein (m, t, x)	420.909 6	X		X	X
P25311	Zinc-alpha-2-glycoprotein (a, b, g, o, u, w)	496.797 9	X			

Classificação das proteínas de acordo com: Função Geral: a) metabolismo; b) processo biológico; c) transporte; d) estrutura e organização estrutural; e) vias de informação; f) miscelânea; Função na PAE: g) metabolismo; h) regeneração tecidual; i) antimicrobiano; j) resposta imune; k) lubrificação; l) biomineralização; m) função biológica desconhecida; Origem: n) origem citoplasmática; o) origem extracelular; p) origem do núcleo; q) origem do citoesqueleto; r) origem intracelular; s) origem da membrana; t) origem proteica desconhecida; Interação: u) interação proteína/proteína; v) ligação cálcio/fosfato; w) outra interação molecular; x) interação molecular desconhecida.

3.6 CONCLUSÃO

Com base em nossos resultados, as hipóteses nulas foram rejeitadas. Os resultados obtidos indicam que a nova técnica desenvolvida por meio das trocas de saliva durante a formação da PAE foi essencial para uma maior identificação de proteínas para a análise proteômica. Além disso, o AC foi a melhor solução para coletar as proteínas da PAE para serem analisadas por espectrometria de massas. Em adição, a quantidade e qualidade das proteínas recuperadas pelo AC foram satisfatórias. Assim, esta solução de coleta apresenta potencial para ser usada no estudo do próximo capítulo, o qual demonstra a necessidade de uma comparação do perfil proteômico entre diferentes condições experimentais (*in vitro*, *in situ* e *in vivo*) da PAE.

A decorative flourish consisting of a thin, dark line that forms a large, elegant loop on the left side, extends horizontally across the middle, and then forms another large loop on the right side. The number '4.' and the text 'APÍTULO 2' are positioned within the left loop.

4. APÍTULO 2

**COMPARAÇÃO DO PERFIL PROTEÔMICO DA PELÍCULA ADQUIRIDA DO
ESMALTE FORMADA EM *IN VITRO*, *IN SITU* OU *IN VIVO***

4.1 INTRODUÇÃO

Este capítulo encontra-se publicado no *European Journal of Oral Sciences*, no ano de 2020, e está intitulado “Proteomic profiles of the acquired enamel pellicle formed *in vitro*, *in situ*, or *in vivo*”. A autoria está representada pela seguinte ordem: Vinícius Taioqui Pelá, João Guilherme Quintal Lunardelli, Talita Mendes Oliveira Ventura, Gabriel Domingues Camiloti, Tommy Baumann, Thiago Saads Carvalho, Adrian Lussi, Marília Afonso Rabelo Buzalaf (Ver a página inicial do artigo em APÊNDICE 2).

Atualmente, ferramentas proteômicas têm sido amplamente empregadas para avaliar os perfis protéicos, na tentativa de entender quais proteínas estão presentes na PAE, bem como o seu papel na proteção contra a dissolução ácida. Mais de 300 proteínas já foram identificadas na PAE (VENTURA *et al.*, 2017), considerando tanto as proteínas da camada basal quanto as que formam a camada globular. Entretanto, um dos principais fatores limitantes da análise proteômica é a pequena quantidade de proteínas que podem ser recuperadas de uma única superfície dentária. Devido a isto, na maioria dos estudos publicados *in vivo*, as proteínas da PAE são coletadas em diferentes superfícies do dente e em toda a arcada dentária. Isso, por um lado, permite a recuperação de maiores quantidades de proteínas a serem analisadas (SIQUEIRA *et al.*, 2007; DELECRODE *et al.*, 2015b; DE SOUZA *et al.*, 2017), porém foi evidenciado que a composição da PAE altera de acordo com a sua localização dentro da cavidade oral (VENTURA *et al.*, 2017). Em adição, alguns estudos *in situ* foram realizados coletando a PAE apenas dos espécimes que podem ser inseridos no aparelho intrabucal e, posteriormente, analisados (DELECRODE *et al.*, 2015a; DELIUS *et al.*, 2017; PELÁ *et al.*, 2018; PELÁ *et al.*, 2019).

Por outro lado, a condição *in vitro* envolvendo a PAE pode ser realizada em laboratório a partir da saliva doada pelos participantes. Embora essa condição *in vitro* seja mais fácil de realizar, ela ainda pode ser desafiadora porque a estrutura da PAE formada em laboratório não é semelhante à condição observada dentro da cavidade oral (estudos *in situ* e *in vivo*), local onde o fluxo salivar ocorre de forma natural. Além disso, o número de proteínas obtidas a partir da PAE formadas *in vitro* é muito limitado (como demonstrado no capítulo anterior), no qual foram identificadas apenas 55 proteínas (PELÁ *et al.*, 2020a). Esta quantidade foi um pouco maior do que o outro estudo realizado *in vitro*, o qual identificou apenas 45 proteínas (SIQUEIRA *et al.*, 2012b).

A utilidade das condições *in vitro* e *in situ* para analisar os perfis proteômicos da PAE pode, portanto, ser questionada, especialmente porque as condições *in vivo* fornecem resultados

mais substanciais e são mais relevantes do ponto de vista clínico. No entanto, existem algumas situações em que o delineamento experimental se torna difícil ou praticamente impossível para se realizar na condição *in vivo*, como por exemplo, quando existe interesse em analisar a PA formada em espécimes de dentina ou em casos em que efeitos mecânicos são investigados; mais especificamente, quando o interesse reside não apenas no efeito que um determinado produto influencie na PAE, mas também o efeito causado na estrutura do dente. Nestes casos, tanto a PAE (por análises proteômicas) quanto a superfície do dente devem ser analisadas por microdureza ou perfilometria. Outro clássico exemplo é a importância para um ensaio de triagem, ou seja, quando vários grupos de tratamentos precisam ser testados (com diferentes concentrações e tempos de aplicação dos agentes ativos, como realizado no capítulo anterior). Nesse caso, experimentos *in vitro* devem ser realizados, pois não requerem a necessidade direta de participantes (apenas a doação de saliva), e podem auxiliar na triagem inicial, a fim de selecionar os melhores grupos para serem testados nas próximas condições, tais como *in situ* ou *in vivo*.

Dada a importância do capítulo anterior ao definir um protocolo eficaz para a formação e coleta da PAE *in vitro*, ainda não se sabe a semelhança da composição proteica da PAE formada *in vitro*, *in situ* e *in vivo*. Além disso, torna-se extremamente importante entender se é possível extrapolar os resultados obtidos em condições *in vitro* e *in situ* para a condição mais clinicamente relevante (*in vivo*).

4.2 OBJETIVO

O objetivo do presente capítulo foi comparar o perfil proteico da PAE formada em diferentes condições experimentais *in vitro*, *in situ* e *in vivo* por espectrometria de massa (LC-ESI-MS/MS).

4.3 HIPÓTESE NULA

A hipótese nula foi de que não há diferenças no perfil proteico da PAE formada em diferentes condições experimentais *in vitro*, *in situ* e *in vivo*.

4.4 MATERIAL E MÉTODOS

4.4.1 Aspectos éticos

Neste estudo, a PAE (em diferentes condições) foi formada e coletada dos mesmos participantes, diante de três condições experimentais: *in vitro*, *in situ* e *in vivo*. Além disso, este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, SP, Brasil (CAAE 86774018.6.0000.5417, ver ANEXO 1), seguindo todas as diretrizes das práticas clínicas, conforme a Declaração de Helsinki.

4.4.2 Seleção dos participantes da pesquisa

Com base em estudos anteriores envolvendo análise proteômica da PAE (SIQUEIRA *et al.*, 2007; DE SOUZA *et al.*, 2017; TAIRA *et al.*, 2018), foram selecionados 9 participantes adultos (idade média de 30 anos) de ambos os sexos (5 mulheres e 4 homens) para participar dos três experimentos do presente estudo, após a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido.

Os critérios de inclusão foram: adultos saudáveis, dispostos a participar de todas as etapas do estudo, sem nenhuma das seguintes características descritas como critérios de exclusão: tabagistas, baixo fluxo salivar (considerando o fluxo não estimulado $> 0,3$ mL/min e o fluxo estimulado $> 1,0$ mL/min), em uso de medicamentos que pudessem alterar o fluxo salivar, presença de lesões de cárie, presença de DDE, gengivite e periodontite. Os participantes receberam um kit contendo escova de dente (Colgate Palmolive, São Paulo, SP, Brasil), creme dental (Sorriso, 1100 ppm F como NaF, Colgate Palmolive, São Paulo, SP, Brasil) e fio dental (Colgate Palmolive, São Paulo, SP, Brasil), a fim de padronizar a higiene bucal ao longo do estudo.

4.4.3 Preparo dos espécimes de esmalte humano

Foram confeccionados 216 espécimes de esmalte humano, sendo 108 para o experimento *in vitro* e 108 para o experimento *in situ*. Estes espécimes foram obtidos a partir da face vestibular de terceiros molares humanos (após o consentimento por escrito dos doadores) das clínicas de cirurgia da Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo. Os dentes foram mantidos em solução de timol tamponado 0,1% (pH 7,0) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) até o momento do preparo dos espécimes. Posteriormente, foi realizada a inspeção visual para avaliar a presença de cáries, manchas e trincas, ocorrências nas quais foram critérios de exclusão para os dentes. Após a separação do dente entre a coroa e a raiz, os espécimes de esmalte foram confeccionados por meio de dois cortes (vertical e horizontal) na superfície vestibular das coroas. Desta forma, foram obtidos espécimes de esmalte padronizados em 4×4 mm (ISOMET Low Speed Saw Buehler, Lake Bluff, IL, EUA).

Além disso, a espessura dos espécimes foi padronizada, ou seja, a superfície dentinária foi desgastada até obter 2 mm de altura.

A superfície vestibular do esmalte foi deixada sem nenhum tratamento e polimento, uma vez que os experimentos foram realizados na superfície nativa do esmalte. Também os espécimes foram limpos com banho ultrassônico (T7 Thornton, a Unique Ind. E Com. Ltda., São Paulo, SP, Brasil) por 7 min a 25 °C. Por fim, os espécimes foram armazenados com gaze umedecida (em geladeira a 4 °C) até o momento dos experimentos *in vitro* e *in situ*.

4.4.4 Coleta de saliva não estimulada

Para o experimento *in vitro*, a PAE foi formada em laboratório com a saliva dos participantes. Para isso, a saliva não estimulada foi coletada no período da manhã. Os nove participantes permaneceram sentados, com a cabeça levemente inclinada para frente, permitindo que toda saliva pingasse em frascos mantidos em gelo (PELÁ *et al.*, 2020a). Em seguida, a saliva foi centrifugada (14.000 g, 20 min a 4 °C), e os sobrenadantes foram coletados e agrupados (*pool*). Finalmente, inibidores de protease (Fenilmetano sulfonil fluoreto - PMSF, N-Ethylmaleimide - NEM e Fenantrolina - Sigma-Aldrich) foram adicionados à saliva na proporção de 1:100 (inibidor:saliva) (PELÁ *et al.*, 2020a) e imediatamente os sobrenadantes da saliva foram divididos em três tubos separados e armazenados a -80 °C, até o início do experimento.

4.4.5 Experimento *in vitro*

O experimento foi conduzido conforme descrito por Pelá (PELÁ *et al.*, 2020a). Antes de cada formação da PAE, os espécimes foram submetidos à profilaxia com pasta de pedra pomes (Pedra Pomes, S.S. Enquanto Artigos Dentários, Rio de Janeiro, RJ, Brasil). Em seguida, a formação da PAE foi realizada (sobre 108 espécimes de esmalte) em placas de 96 poços com a adição de 250 µL de saliva para cada espécime a 37 °C, sob constante agitação (300 rpm) (Figura 2A). A PAE foi formada dentro do Thermomixer comfort (Eppendorf AG 22331 – Germany) no tempo de 120 min e, durante esse período, a alíquota de saliva foi substituída por uma nova a cada 30 min (como descrito no capítulo anterior); isso foi feito para mimetizar o fluxo salivar dos experimentos *in situ* e *in vivo*. Posteriormente, os espécimes foram imediatamente lavados com água deionizada (5 s) e secos (3 s). Para a coleta da PAE, foi utilizado um papel de filtro de eletrodo de 5 × 10 mm (Electrode Wick, Bio-Rad, Hercules, Califórnia, CA, EUA) umedecido em ácido cítrico a 3% (Sigma-Aldrich). O excesso do ácido foi removido com papel absorvente e esfregado na superfície dos espécimes (sem pressão) com

o auxílio de pinças (SIQUEIRA *et al.*, 2007). Um papel filtro de eletrodo foi usado para cada seis espécimes. Depois, os papeis foram rapidamente armazenados em tubos e congelados a -80 °C, até o preparo para a análise proteômica. Este experimento foi repetido mais duas vezes, sendo realizado durante três dias consecutivos (coleta em triplicata) (Figura 2).

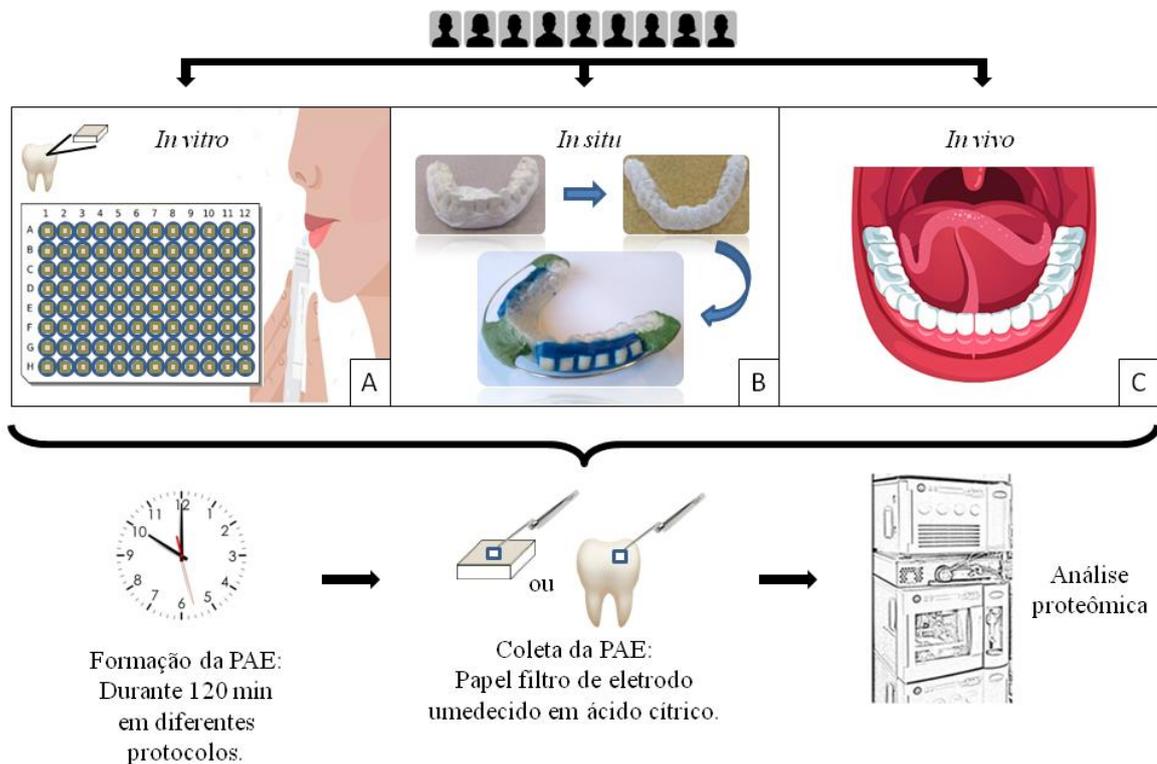


Figura 2. Resumo do esquema metodológico das diferentes condições de PAE. Demonstração da presença dos mesmos participantes em todos os experimentos: A) *in vitro*, B) *in situ*, e C) *in vivo*, bem como a formação e coleta da PAE para análise proteômica.

4.4.6 Experimento *in situ*

Para este experimento, foram utilizados 108 espécimes de esmalte humano. Além disso, foram confeccionados três aparelhos intraorais (mandibulares) para cada participante. Para isso, eles foram moldados com alginato para a confecção do modelo de gesso. Sobre este modelo, foi feita uma moldeira de silicone contendo os nichos para a fixação dos espécimes, os quais foram colados com cera de modelagem (Asfer Indústria Química Ltda., São Caetano do Sul, São Paulo, Brasil). Para evitar o atrito com a mucosa e favorecer a formação da PAE, foi fixado um fio ortodôntico nº 8 (Morelli Ortodontia, Sorocaba, SP, Brasil) sobre todo o arco da moldeira da face vestibular. Este dispositivo mandibular, chamado “Bauru *in situ* pellicle model”

(BISPM) foi desenvolvido pelo nosso grupo e demonstrou bons resultados para a formação da PAE para análise proteômica (PELÁ *et al.*, 2018).

Em cada aparelho oral, foram alocados aleatoriamente 12 espécimes de esmalte, sendo 6 para cada lado (Figura 2B). O aparelho foi colocado sobre os dentes mandibulares dos participantes, contendo os espécimes de esmalte na face vestibular, a partir dos pré-molares/molares. Antes de cada formação da PAE, todos os espécimes foram submetidos à profilaxia com pasta de pedra pomes (Pedra Pomes, S.S. Enquanto Artigos Dentários, Rio de Janeiro, RJ, Brasil). Em seguida, a PAE foi formada durante 120 min (período da manhã: 8:00 às 10:00 h) para evitar efeitos circadianos (ZIMMERMAN *et al.*, 2013). Durante este período, os participantes não foram autorizados a comer ou beber. Posteriormente, o aparelho foi retirado da boca e os espécimes foram lavados com água deionizada (5 s) e secos (3 s) (PELÁ *et al.*, 2018). A coleta da PAE foi realizada com o mesmo procedimento descrito para a o experimento *in vitro*. Além disso, este protocolo foi repetido mais duas vezes, sendo realizado durante três dias consecutivos.

4.4.7 Experimento *in vivo*

Inicialmente, os participantes receberam uma profilaxia profissional com pasta de pedra pomes (Pedra Pomes, S.S. Enquanto Artigos Dentários, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) e foram orientados a não comer ou beber durante os 120 min de formação da PAE, que também ocorreu no período da manhã (ZIMMERMAN *et al.*, 2013; VENTURA *et al.*, 2017). Para a coleta da PAE, as superfícies vestibulares dos dentes inferiores foram lavadas com água deionizada (5 s), secas com ar comprimido (3 s) e isoladas com rolos de algodão. Doze áreas de 4 mm × 4 mm (6 de cada lado do arco mandibular) foram selecionadas e corresponderam exatamente ao mesmo posicionamento dos espécimes de esmalte do experimento *in situ* (superfície vestibular dos pré-molares/molares) (Figura 2C). A PAE foi coletada dessas 12 áreas, usando os mesmos procedimentos das etapas *in vitro* e *in situ*. O experimento foi repetido mais duas vezes, sendo realizado durante três dias consecutivos.

4.4.8 Preparo da PAE para análise proteômica

Todos os papéis filtro de eletrodo contendo a PAE dos três dias (coleta triplicada) do experimento, foram agrupados de acordo com cada condição experimental (*in vitro*, *in situ* e *in vivo*). O protocolo de preparo da PAE para a análise proteômica foi realizado (VENTURA *et al.*, 2017). Resumidamente, as proteínas foram extraídas usando uma solução contendo 6 M de uréia, 2 M de tiouréia em 50 mM de NH₄HCO₃ (Sigma-Aldrich), pH 7,8. Posteriormente, as

amostras foram colocadas em tubos Falcon Amicon (Amicon Ultra - 15 Centrifugal Filter Units - Merck Millipore, Tullagreen, CO, IRL), centrifugadas e concentradas até aproximadamente 150 μ L. Em seguida, as amostras foram quantificadas, usando o método de Bradford (Bio-Rad, Hercules, Califórnia, CA, EUA). Depois, as amostras foram reduzidas (5 mM ditioneitol - Sigma-Aldrich), alquiladas (10 mM iodoacetamida - Sigma-Aldrich) e digeridas por 14 h a 37 °C pela adição de 2% (p/p) de tripsina (Promega, Madison, WI, EUA). Colunas C18 Spin (Thermo Scientific, Rockford, IL, EUA) foram usadas para dessalinizar e purificar as amostras. As concentrações de proteínas foram quantificadas novamente, usando o método de Bradford (Bio-Rad, Hercules, Califórnia, CA, EUA). Então, foi calculada a quantidade total de proteínas obtidas para cada condição experimental. Em seguida, todas as amostras foram ajustadas para a mesma concentração e ressuspensas em solução contendo 3% de acetonitrila (Sigma-Aldrich) e 0,1% de ácido fórmico (Sigma-Aldrich). Por fim, as amostras foram submetidas ao espectrômetro de massas (LC-ESI-MS/MS).

4.4.9 Análise proteômica livre de marcadores

A identificação dos peptídeos foi realizada pelo espectrômetro de massa Xevo (MS) acoplado ao nanoACQUITY UPLC (Ultra-Performance Liquid Chromatography) (Waters, Manchester, NH, UK) (VENTURA *et al.*, 2017). O nanoACQUITY UPLC foi equipado com uma coluna nanoACQUITY HSS T3 analítica de fase reversa (75 μ m \times 150 mm, tamanho de partícula de 1,8 μ m, Waters). O PROTEINLYNX GLOBAL SERVER™ (PLGS) versão 3.0 foi usado para processar e pesquisar a espectrometria de massa contínua por cromatografia líquida no modo de análise independente de dados. As amostras (de cada experimento) foram analisadas em triplicata (triplicatas técnicas). As proteínas foram identificadas pelo banco de dados *Homo sapiens*, baixado em abril de 2017 do UniProtKB (<http://www.uniprot.org/>). Além disso, as proteínas foram classificadas de acordo com a função biológica (dentro da PAE) (RISON *et al.*, 2000; ZIMMERMAN *et al.*, 2013), origem e interação molecular (<http://www.uniprot.org/>).

Para o proteoma quantitativo, foram analisados três arquivos brutos do espectrômetro de massa de cada grupo (de acordo com a condição experimental: *in vitro*, *in situ* ou *in vivo*), usando o software PLGS. Todas as proteínas identificadas com pontuação de confiança superior a 95% foram incluídas na análise quantitativa. A diferença de expressão entre os grupos foi expressa como $p < 0,05$ para proteínas subreguladas e $1 - p > 0,95$ para proteínas supereguladas (SIQUEIRA *et al.*, 2007; VENTURA *et al.*, 2017; PELÁ *et al.*, 2019). As seguintes

comparações foram realizadas: *in vitro* versus *in situ*, *in vitro* versus *in vivo* e *in situ* versus *in vivo*.

4.5 RESULTADOS

4.5.1 Identificação de proteínas totais e para cada grupo

Foram identificadas 321 proteínas totais no presente estudo (Figura 3A; Tabela 1). O número de proteínas identificadas em cada condição experimental foi de 66, 174 e 170 para *in vitro*, *in situ* e *in vivo*, respectivamente (Tabela 3). A quantidade (μg) de proteínas obtida pelo método de Bradford em cada experimento foi de 8,88 μg , 52,04 μg e 49,08 μg para *in vitro*, *in situ* e *in vivo*, respectivamente. Foram encontradas apenas 23 proteínas em comum nas três condições experimentais (Figura 3A), das quais 15 são comumente consideradas proteínas típicas da PAE, ou seja, alfa-amilase, proteína rica em prolina salivar básica, cistatina, histatina, lisozima, mucina, alfa-amilase pancreática, proteína rica em prolina, hemoglobina, fosfoproteína $\frac{1}{2}$ rica em prolina ácida salivar, imunoglobulinas, proteína S100, proteína submaxilar e estaterina, (Figura 3B).

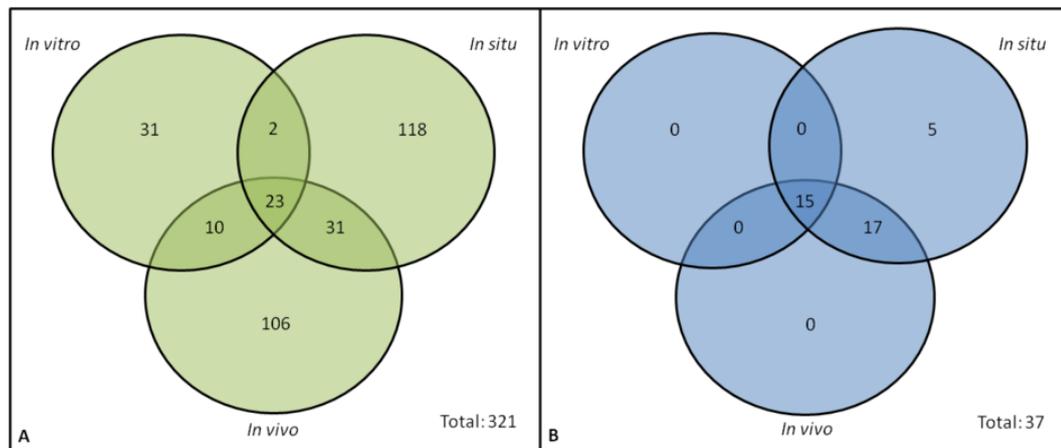


Figura 3. Diagrama de Venn entre as diferentes condições. Representação da quantidade de proteínas exclusivas de cada grupo e da quantidade de proteínas identificadas entre dois ou mais grupos. (A) representa proteínas totais. (B) representa proteínas típicas da PAE.

Na condição *in vitro*, 31 proteínas não foram identificadas em comparação com as demais condições. Dentre elas, 17 são usualmente consideradas proteínas típicas da PAE, tais como cistatina-D, histatina-3, onze isoformas de imunoglobulina, lisozima, proteína rica em prolina 27, duas isoformas da proteína S100. Com relação à condição *in situ*, 10 proteínas não foram encontradas quando comparadas a demais condições, porém nenhuma delas foi considerada proteína típica da PAE (Tabela 1).

Foram identificadas 15 proteínas típicas da PAE no estudo (destacadas em negrito - Tabela 1). Os números em cada condição experimental foram 15, 37 e 32 para *in vitro*, *in situ* e *in vivo*, respectivamente (Tabela 1). O número de proteínas totais identificadas exclusivamente em apenas uma das condições foram 31, 118 e 106, para *in vitro*, *in situ* e *in vivo*, respectivamente (Figura 3). Duas isoformas de cistatinas (B e C), duas isoformas de imunoglobulina e a lisozima foram encontradas apenas na condição *in situ* (Figura 3B e Tabela 1).

Quando as condições *in vitro* e *in situ* foram comparadas, foram identificadas 25 proteínas em comum, dentre as quais 15 proteínas são comumente consideradas típicas da PAE (duas isoformas de alfa-amilase, duas isoformas de proteína básica salivar rica em prolina, três isoformas de cistatina, histatina-1, lisozima C, mucina-7, alfa-amilase pancreática, proteína 4 rica em prolina, fosfoproteína ½ rica em prolina ácida salivar, estaterina e proteína 3B regulada por androgênio da glândula submaxilar). Na comparação entre as condições *in vitro* e *in vivo*, foram encontradas 33 proteínas em comum, das quais 15 proteínas são comumente consideradas típicas da PAE (duas isoformas de alfa-amilase, duas isoformas de proteína básica salivar rica em prolina, três isoformas de cistatina, histatina-1, lisozima C, mucina-7, alfa-amilase pancreática, proteína 4 rica em prolina, fosfoproteína ½ rica em prolina ácida salivar, estaterina e proteína 3B regulada por androgênio da glândula submaxilar). Na última comparação envolvendo as condições *in situ* e *in vivo*, foram apresentadas 54 proteínas em comum, dentre as quais 32 são proteínas comumente típicas da PAE, tais como duas isoformas de alfa-amilase, duas isoformas de proteína básica salivar rica em prolina, quatro isoformas de cistatina, duas isoformas de histatina, onze isoformas de imunoglobulina, duas isoformas de lisozima, mucina-7, alfa-amilase pancreática, duas isoformas de proteína rica em prolina, duas isoformas de proteína S100, fosfoproteína ½ rica em prolina ácida salivar, estaterina e glândula submaxilar proteína 3B regulada por andrógeno) (Figura 3; Tabela 1).

Tabela 2. Classificação das proteínas identificadas na PAE. Diferentes condições: *in vitro*, *in situ* e *in vivo*.

Número de acesso	Nome da proteína	Score	<i>in vitro</i>	<i>in situ</i>	<i>in vivo</i>
P31946	14-3-3 protein beta/alpha ^(f, m, n, p, u, w)	1674.63		x	
P62258	14-3-3 protein epsilon ^(f, m, n, p, u, w)	1674.63		x	
Q04917	14-3-3 protein eta ^(f, m, n, p, u, w)	1674.63		x	
P61981	14-3-3 protein gamma ^(f, m, n, p, u, w)	1800.55		x	
P31947	14-3-3 protein sigma ^(f, m, n, p, u, w)	1886.59		x	

P27348	14-3-3 protein theta (f, m, n, p, u, w)	1674.63		x	
P63104	14-3-3 protein zeta/delta (f, m, n, p, u, w)	1800.24		x	
V9GYC0	2-(3-amino-3-carboxypropyl)histidine synthase subunit 1 (Fragment) (f,m, t, x)	728.23			x
P05386	60S acidic ribosomal protein P1 (b, m, n, x)	919.65		x	
A0A087X126	Acetyl-CoA carboxylase 1 (e, m, p, q, x)	665.31		x	
P68032	Actin_ alpha cardiac muscle 1 (d, m, n, q, u, w)	1885.77	x	x	x
P68133	Actin_ alpha skeletal muscle (b, d, m, n, q, u, w)	2004.43	x	x	x
P62736	Actin_ aortic smooth muscle (b, d, m, n, q, u)	1885.77	x	x	x
P60709	Actin_ cytoplasmic 1 (b, m, n, q, u, w)	2985.07	x	x	x
P63261	Actin_ cytoplasmic 2 (b, m, n, q, u, w)	2985.07	x	x	x
P63267	Actin_ gamma-enteric smooth muscle (b, m, n, q, u, w)	1885.77	x	x	x
Q8TC94	Actin-like protein 9 (b, m, n, q, u, w)	422.96	x		
Q08AH3	Acyl-coenzyme A synthetase ACSM2A_ mitochondrial (e, m, p, q, x)	265.28		x	
E9PMH1	Adenine DNA glycosylase (b, m, t, x)	539.27			x
Q86V24	Adiponectin receptor protein 2 (a, m, o, w)	235.52			x
C9JKR2	Albumin_ isoform CRA_k (c, g, o,i ,u)	1711.85		x	x
P04745	Alpha-amylase 1 (a, g, o, u)	9813.22	x	x	x
P19961	Alpha-amylase 2B (a, g, o, u)	8374.85	x	x	x
Q9BVH7	Alpha-N-acetylgalactosaminide alpha-2_6-sialyltransferase 5 (b, m, r, u)	299.31		x	
G5E9N5	ALS2 C-terminal like_ isoform CRA_a (b, m, t, x)	380.31		x	
Q60I27	ALS2 C-terminal-like protein (b, m, t, x)	380.31		x	
E7EQT3	Anion exchange protein (b, m, t, x)	337.89			x
H7C4W8	Ankyrin repeat and BTB/POZ domain-containing protein 1 (Fragment) (b, m, t, x)	985.99		x	
Q9P2G1	Ankyrin repeat and IBR domain-containing protein 1 (b, m, t, x)	191.36		x	
H0YLV6	Annexin (a, b, g, j, n, o, u)	1722.39		x	x
P04083	Annexin A1 (a, b, g, j, n, o, u)	1754.89		x	x
P07355	Annexin A2 (a, b, g, i, j, o, u)	2923.51		x	
P03973	Antileukoproteinase (a, b, g, i, j, o, u)	2864.25		x	
J3KRM4	Aquaporin-4 (Fragment) (b, m, t, x)	294.37			x
Q86TY3	Armadillo-like helical domain-containing protein 4 (b, m, t, x)	395.94			x
Q8IZY2	ATP-binding cassette sub-family A member 7 (b, m, r, x)	324.78			x
F5H5Q0	ATP-binding cassette sub-family B member 9 (Fragment) (b, m, r, x)	338.2	x		

Q9UNQ0	ATP-binding cassette sub-family G member 2 (b, m, r, x)	396.44	x		
J3KS37	ATP-dependent DNA helicase Q5 (Fragment) (b, m, r, x)	1213.98		x	
Q86XP3	ATP-dependent RNA helicase DDX42 (b, m, r, x)	391.21		x	
Q13490	Baculoviral IAP repeat-containing protein 2 (b, m, p, u)	460.24	x		
P04280	Basic salivary proline-rich protein 1 (b, l, o, u)	8968.54	x	x	x
P02812	Basic salivary proline-rich protein 2 (b, l, o, u)	11360.25	x	x	x
Q13286	Battenin (b, m, r, w)	299.92			x
Q562R1	Beta-actin-like protein 2 (b, m, n, u, w)	435.8		x	x
Q9UL45	Biogenesis of lysosome-related organelles complex 1 subunit 6 (b, m, n, w)	532.36		x	
Q8N4F0	BPI fold-containing family B member 2 (b, m, o, u)	713.2		x	
Q8N4G4	CA6 protein (b, m, t, u)	354.25		x	
A0PJX0	Calcium and integrin-binding family member 4 (b, m, t, v)	448.84		x	
A0A1B0GW24	Calcium-binding protein 2 (b, m, t, v)	527.39	x		
P27482	Calmodulin-like protein 3 (a, g, o, u)	824.53		x	x
Q9BQT9	Calsyntenin-3 (a, b, m, r, w)	231.62			x
P0C5K7	Cancer/testis antigen 62 (b, m, t, x)	304.76			x
Q6F5E8	Capping protein_Arp2/3 and myosin-I linker protein 2 (a, b, m, r, u)	295.3			x
P23280	Carbonic anhydrase 6 (a, g, o, u)	1386.79		x	
E9PM31	CD81 antigen (Fragment) (b, m, o, u)	727.88			x
Q96SN8	CDK5 regulatory subunit-associated protein 2 (b, m, o, u)	318.83		x	
A2ABF0	cDNA FLJ39914 fis_ clone SPLEN2018732_ highly similar to MutS protein homolog 5 (b, m, o, u)	230.41			x
B4DJV5	cDNA FLJ51513_ highly similar to Periodic tryptophan protein 1 homolog (b, m, o, u)	775.97	x		
B4DJF2	cDNA FLJ51975_ moderately similar to 14-3-3 protein epsilon (14-3-3E) (b, m, o, u)	1674.63		x	
B4DRP8	cDNA FLJ54872_ highly similar to Zinc finger protein 461 (b, m, o, u)	556.01			x
Q8N163	Cell cycle and apoptosis regulator protein 2 (a, b, e, m, p, w)	104.89			x
A6PVI9	Centrosomal protein 250kDa (b, m, q, x)	421.69			x
H0YD38	Centrosome-associated protein 350 (Fragment) (b, m, n, q, u, w)	503.98			x

Q9BV73	Centrosome-associated protein CEP250 (b, m, n, q, u, w)	522.88			x
Q14839	Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 4 (b, m, p, u, w)	311.16		x	
Q5BJE1	Coiled-coil domain-containing protein 178 (b, m, t, u)	249.07			x
Q9UP83	Conserved oligomeric Golgi complex subunit 5 (b, m, r, u, w)	253.52			x
Q9UBG3	Cornulin (b, m, n, x)	248.91		x	
P24387	Corticotropin-releasing factor-binding protein (b, m, o, u)	610.77	x		
Q13363	C-terminal-binding protein 1 (d,e,m,n,p,u,w)	274.24			x
P56545	C-terminal-binding protein 2 (d,e,m,n,p,u,w)	256.32			x
P04080	Cystatin-B (a, g, n, p, u)	2098.64		x	
P01034	Cystatin-C (a, g, n, p, u)	697.59		x	
P28325	Cystatin-D (a, g, n, p, u)	626.39		x	x
P01036	Cystatin-S , (i, n, o, s, u)	32132.96	x	x	x
P09228	Cystatin-SA (a, b, g, o, u)	8912.6	x	x	x
P01037	Cystatin-SN (a, g, n, p, u)	25561.2	x	x	x
E7EVJ5	Cytoplasmic FMR1-interacting protein (b, m, t, x)	390.34		x	
Q96F07	Cytoplasmic FMR1-interacting protein 2 (b, m, t, x)	426.14		x	
O43293	Death-associated protein kinase 3 (b, m, t, x)	265.43			x
Q9UGM3	Deleted in malignant brain tumors 1 protein (f, m, n, o, v, w)	392.39		x	
Q9ULE3	DENN domain-containing protein 2A (b, m, n, w)	334		x	
A0A024RCV8	DNA mismatch repair protein (b, m, p, u)	300.97			x
Q9NRD9	Dual oxidase 1 (b, m, s, w)	286.57		x	
P50570	Dynamin-2 (b, f, m, s, u, w)	251.07			x
P51808	Dynein light chain Tctex-type 3 (b, m, p, u)	402.77		x	
Q9BY07	Electrogenic sodium bicarbonate cotransporter 4 (b, m, s, u)	337.89			x
P61576	Endogenous retrovirus group K member 104 Rec protein (b, m, n, p, w)	389.68		x	
E5RHX4	Endonuclease V (Fragment) (b, m, t, x)	550.79	x		
P14138	Endothelin-3 (b, m, o, w)	502.79		x	
H0YCS2	Erythroid differentiation-related factor 1 (Fragment) (b, m, t, x)	300.51			x
Q8TBG4	Ethanolamine-phosphate phospho-lyase (b, m, r, w)	274.36		x	
J3KS25	Eukaryotic initiation factor 4A-I (Fragment) (b, m, t, x)	243.13		x	

O15360	Fanconi anemia group A protein (e, m, n, p, u)	593.35		x	
Q8NFU4	Follicular dendritic cell secreted peptide (b, m, o, u)	1669.46		x	
A0A0B4J2F3	Forkhead box protein P1 (b, m, p, x)	518.34	x	x	
Q6ZVF9	G protein-regulated inducer of neurite outgrowth 3 (b, m, t, x)	266.24		x	
P09104	Gamma-enolase (a, g, n, s, u)	49.53			x
Q8WUA4	General transcription factor 3C polypeptide 2 (b, m, p, u, w)	1076.81		x	
A0A2R8YDR7	Glutamine amidotransferase-like class 1 domain-containing 3A (Fragment) (b, m, t, x)	232.08			x
A0A0C4DFM0	Glutathione transferase zeta 1 (Maleylacetoacetate isomerase)_isoform CRA_c (b, m, r, x)	672.97		x	
P00738	Haptoglobin (a, b, g, i, j, o, u, w)	199.48			x
C9IZQ6	HCG2022551_isoform CRA_j (b, m, t, x)	305.11		x	
P04792	Heat shock protein beta-1 (b, d, m, n, p, q, u, w)	2216.87		x	x
Q9Y5Z4	Heme-binding protein 2 (b, m, r, x)	270.69			x
P68871	Hemoglobin subunit beta (b, c, m, n, o, u, w)	436.99	x		x
P02042	Hemoglobin subunit delta (b, c, h, n, o, u, w)	355.09	x		x
P02100	Hemoglobin subunit epsilon (a, e, g, h, n, u, w)	355.09	x		x
P69891	Hemoglobin subunit gamma-1 (b, c, h, n, o, u, w)	355.09	x		x
P69892	Hemoglobin subunit gamma-2 (b, c, m, n, u)	355.09	x		x
Q9BQS7	Hephaestin (c, m, s, w)	382.25	x		
P15515	Histatin-1 (b, i, l, o, u)	5431.93	x	x	x
P15516	Histatin-3 (b, i, l, o, u)	1700.03		x	x
Q9BY41	Histone deacetylase 8 (b, m, p, u, w)	946.39		x	
U3KQK0	Histone H2B (b, m, p, u, w)	455.26			x
Q96A08	Histone H2B type 1-A (b, m, p, u)	410.26			x
P33778	Histone H2B type 1-B (b, m, p, u, w)	455.26			x
P62807	Histone H2B type 1-C/E/F/G/I (b, i, j, p, u, w)	455.26			x
P58876	Histone H2B type 1-D (b, m, p, u)	455.26			x
Q93079	Histone H2B type 1-H (b, m, p, u, w)	455.26			x
P06899	Histone H2B type 1-J (b, i, j, p, u, w)	455.26			x
O60814	Histone H2B type 1-K (b, i, j, p, u, w)	455.26			x
Q99880	Histone H2B type 1-L (b, m, p, u, w)	455.26			x
Q99879	Histone H2B type 1-M (b, m, p, u)	455.26			x
Q99877	Histone H2B type 1-N (b, m, p, u)	455.26			x

P23527	Histone H2B type 1-O (b, m, p, u, w)	455.26			x
Q16778	Histone H2B type 2-E (b, i, j, p, u, w)	455.26			x
Q5QNW6	Histone H2B type 2-F (b, m, p, u, w)	455.26			x
Q8N257	Histone H2B type 3-B (b,m,p,u,w)	455.26			x
P57053	Histone H2B type F-S (b, i, j, p, u, w)	455.26			x
Q4G0P3	Hydrocephalus-inducing protein homolog (b, m, q, u)	282.01			x
G5E9S2	Hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 4_ isoform CRA_a (b, m, r, w)	169.61			x
P01876	Immunoglobulin heavy constant alpha 1 (b, e, i, j, o, u)	4980.67		x	x
P01877	Immunoglobulin heavy constant alpha 2 (b, e, i, j, o, u)	2059.95		x	x
P01857	Immunoglobulin heavy constant gamma 1 (b, j, o, u, w)	751.51		x	x
P01860	Immunoglobulin heavy constant gamma 3 (b, e, j, o, u, w)	274.77		x	x
P01861	Immunoglobulin heavy constant gamma 4 (b, e, j, o, u, w)	577.15		x	
P01591	Immunoglobulin J chain (b, e, j, o, u, w)	1355.44		x	x
P01834	Immunoglobulin kappa constant (b, e, j, o, u, w)	551.64		x	x
P0CG04	Immunoglobulin lambda constant 1 (b, e, j, o, u, w)	439.82		x	x
P0DOY2	Immunoglobulin lambda constant 2 (b, e, j, o, u, w)	439.82		x	x
P0DOY3	Immunoglobulin lambda constant 3 (b, e, j, o, u, w)	439.82		x	x
P0CF74	Immunoglobulin lambda constant 6 (b, e, j, o, u, w)	439.82		x	x
A0M8Q6	Immunoglobulin lambda constant 7 (b, e, j, o, u, w)	2166.53		x	
B9A064	Immunoglobulin lambda-like polypeptide 5 (b, e, j, o, u, w)	439.82		x	x
Q9H160	Inhibitor of growth protein 2 (b, e, m, p, u, w)	285.06		x	
I3LOW8	INO80 complex subunit E (Fragment) (b, m, p, x)	325.61			x
Q8N201	Integrator complex subunit 1 (b, e, m, p, w)	371.54		x	
A0A087X131	Integrin alpha-X (b, m, t, x)	389.65	x		
P01570	Interferon alpha-14 (b, m, o, w)	264.93			x
F6SRW8	Intraflagellar transport protein 88 homolog (Fragment) (b, m, t, x)	588.38	x		
O60229	Kalirin (b, c, m, n, q, u)	327.99		x	
Q9NVX7	Kelch repeat and BTB domain-containing protein 4 (b, m, t, x)	441.78		x	

P13645	Keratin_ type I cytoskeletal 10 ^(d, m, n, o, p, s, u)	235.01			x
P13646	Keratin_ type I cytoskeletal 13 ^(d, m, o, u, w)	1776.64		x	
P13646	Keratin_ type I cytoskeletal 13 ^(d, m, o, u, w)	1776.64			x
P19012	Keratin_ type I cytoskeletal 15 ^(b, m, o, u, w)	253.04			x
Q6A162	Keratin_ type I cytoskeletal 40 ^(b, m, o, u, w)	218.43			x
P19013	Keratin_ type II cytoskeletal 4 ^(d, m, q, u)	217.78		x	x
P02538	Keratin_ type II cytoskeletal 6A ^(b, d, m, o, u, w)	198.39			x
P04259	Keratin_ type II cytoskeletal 6B ^(b, i, o, u, w)	206.89			x
P48668	Keratin_ type II cytoskeletal 6C ^(d, m, o, u)	198.39			x
M0R2L7	Kinase ^(b, m, t, x)	612.35	x		
P02788	Lactotransferrin ^(f, g, h, i, j, n, o, p, u, w)	330.26			x
Q6ZRR7	Leucine-rich repeat-containing protein 9 ^(b, m, t, x)	244.43		x	
O43561	Linker for activation of T-cells family member 1 ^(b, f, m, s, u)	323.8		x	
O75334	Liprin-alpha-2 ^(b, m, n, w)	270.57		x	
H0YHJ4	Liprin-alpha-2 (Fragment) ^(b, m, n, w)	266.33			x
O75015	Low affinity immunoglobulin gamma Fc region receptor III-B ^(b, f, m, o, s, w)	232.44		x	
Q6UWN5	Ly6/PLAUR domain-containing protein 5 ^(b, m, s, w)	314.86		x	
F8VV31	Lysozyme B ^(a, b, g, i, j, o, u, w)	5690.41		x	x
P61626	Lysozyme C ^(a, b, g, i, j, o, u, w)	7859.76	x	x	x
F8VV32	Lysozyme A ^(a, b, g, i, j, o, u, w)	5690.41		x	
O43708	Maleylacetoacetate isomerase ^(b, e, m, n, w)	672.97		x	
Q13296	Mammaglobin-A ^(b, m, o, s)	426.31			x
Q9UM22	Mammalian ependymin-related protein 1 ^(b, m, o, x)	439.34	x		
F5H881	Matrix metalloproteinase (Fragment) ^(b, m, o, x)	533.4		x	
Q9ULZ9	Matrix metalloproteinase-17 ^(b, m, o, x)	533.4		x	
D6RGY6	Membrane-associated transporter protein ^(b, m, t, x)	671.83		x	
P27816	Microtubule-associated protein 4 ^(b, m, t, x)	328.82	x		
O15021	Microtubule-associated serine/threonine-protein kinase 4 ^(b, m, t, x)	343.02		x	
Q9BQP7	Mitochondrial genome maintenance exonuclease 1 ^(b, f, m, r, w)	554.05	x		
Q9NYZ2	Mitoferrin-1 ^(b, m, r, u)	316.97	x		x
A0A0G2JJ70	MSH5-SAPCD1 readthrough (NMD candidate) (Fragment) ^(b, m, t, x)	300.97			x
Q8TAX7	Mucin-7 ^(b, i, k, o, u)	12786.75	x	x	x

O43196	MutS protein homolog 5 (b, m, t, w)	300.97			x
Q8N699	Myc target protein 1 (b, m, p, u)	274.11		x	
A0A0G2JI50	Negative elongation factor E (Fragment) (b, m, p, x)	398.23	x		
P21359	Neurofibromin (b, m, p, x)	359.77		x	
Q9Y6K9	NF-kappa-B essential modulator (b, m, p, w)	278.87		x	
O15527	N-glycosylase/DNA lyase (b, m, p, w)	222.58			x
Q14112	Nidogen-2 (b, m, o, w)	290.7		x	
Q2L696	Nucb2 splice variant (b, m, t, x)	565.55		x	
O75376	Nuclear receptor corepressor 1 (b, m, p, u, w)	711.52	x	x	
P51843	Nuclear receptor subfamily 0 group B member 1 (b, m, p, u, w)	326.62		x	
A0A087WSV8	Nucleobindin 2_ isoform CRA_b (b, m, t, x)	565.55		x	
P80303	Nucleobindin-2 (b, m, t, x)	565.55		x	
Q8NGF1	Olfactory receptor 52R1 (b, m, s, u)	346.51			x
F5H6P8	Oligoribonuclease_ mitochondrial (b, m, t, x)	684.18		x	
A0A1W2PRA8	Paired box gene 6 (Aniridia_ keratitis)_ isoform CRA_b (b, m, p, x)	414.9		x	
D1KF47	Paired box protein 6 isoform c (b, m, p, x)	414.9		x	
P26367	Paired box protein Pax-6 (b, m, p, x)	414.9		x	
Q8WX93	Palladin (a, b, d, m, n, w)	452.57	x		x
P04746	Pancreatic alpha-amylase (a, g, o, u)	36317.12	x	x	x
Q13610	Periodic tryptophan protein 1 homolog (b, m, p, u, w)	775.97	x		
P51659	Peroxisomal multifunctional enzyme type 2 (b, m, r, u)	170.41			x
J3KN95	Phosphoacetylglucosamine mutase (b, m, t, x)	256.93		x	
Q8NEL9	Phospholipase DDHD1 (b, m, t, x)	320.98		x	
E9PEJ6	Phospholipid-transporting ATPase (b, m, t, x)	459.93	x		
Q9H7P9	Pleckstrin homology domain-containing family G member 2 (b, m, r, w)	338.83		x	
Q9ULL4	Plexin-B3 (b, m, s, u, w)	341.81			x
P01833	Polymeric immunoglobulin receptor (d, e, m, s, x)	329.08		x	x
Q92989	Polyribonucleotide 5'-hydroxyl-kinase Clp1 (a, b, m, p, w)	470.05			x
Q6S8J3	POTE ankyrin domain family member E (b,m,o,u)	1243.55	x	x	x
A5A3E0	POTE ankyrin domain family member F (b,m,o,u)	1243.55	x	x	x

P0CG38	POTE ankyrin domain family member I (b,m,o,u)	558.39		x	
P0CG39	POTE ankyrin domain family member J (a, b, m, o, u)	267		x	x
Q6GQY8	PPP1R12B protein (b, m, t, x)	278.2			x
Q9UKI3	Pre-B lymphocyte protein 3 (b, m, o, u)	401.54		x	
Q96HY7	Probable 2-oxoglutarate dehydrogenase E1 component DHKTD1_ mitochondrial (b, m, r, u)	313.45	x		x
A0A0U1RRG6	Probable global transcription activator SNF2L2 (Fragment) (b, m, r, u)	298.07		x	
P98196	Probable phospholipid-transporting ATPase IH (b, m, r, u)	475.83	x		
P07737	Profilin-1 (d, h, n, o, p, q, s, u, w)	499.35			x
P12273	Prolactin-inducible protein (b, d, m, o, u)	8194.46		x	x
Q6MZM9	Proline-rich protein 27 (b, l, o, x)	302.96		x	x
A0A0A0MT31	Proline-rich protein 4 (b, l, p, u)	20083.22	x	x	x
E9PIE2	Protein arginine N-methyltransferase 1 (b, m, t, x)	769.38	x		
E7EQI9	Protein CBFA2T1 (Fragment) (b, m, t, x,)	681.02		x	
Q4TT65	Protein disulfide isomerase family A_ member 2 (Fragment) (b, m, t, x,)	318.35		x	
Q49AJ0	Protein FAM135B (b, m, t, x,)	305.41		x	
Q9H0Q0	Protein FAM49A (b, m, t, x,)	286.85			x
A2RTY3	Protein HEATR9 (b, m, t, x,)	409.95		x	
A5PL33	Protein KRBA1 (b, m, t, x,)	468.99		x	
Q6P5S2	Protein LEG1 homolog (b, m, o, x)	416.07		x	x
O60237	Protein phosphatase 1 regulatory subunit 12B (b, m, r, u, w)	298.79			x
Q5JSZ5	Protein PRRC2B (b, m, t, u)	482.46		x	
X6R9J3	Protein prune homolog 2 (b, m, t, x)	275.47		x	
P05109	Protein S100-A8 (b, e, i, j, l, n, o, q, s, u, w)	1980.55		x	x
P06702	Protein S100-A9 (a, b, g, i, j, n, o, q, s, u, w)	21014.87		x	x
A8K8P3	Protein SFI1 homolog (b, m, q, v)	326.88		x	
A0A0U1RR58	Protein transport protein Sec24C (b, m, t, x)	615.88		x	
Q9NQW1	Protein transport protein Sec31B (b, m, t, x)	733.14	x		
H7C3T6	Protein tweety homolog (Fragment) (b, m, t, x)	489.51	x		
Q9C0H2	Protein tweety homolog 3 (b, m, t, x)	489.51	x		
Q9Y5H5	Protocadherin alpha-9 (b, m, s, u)	241.62			x
A6NMY6	Putative annexin A2-like protein (a, m, n, q, u, w)	2923.51		x	
Q9BYX7	Putative beta-actin-like protein 3 (a, m, n, q, u, w)	352.7			x

A6NE21	Putative protein FAM90A18P/FAM90A19P (a, m, n, q, u, w)	221.32			x
Q2M3A8	Putative uncharacterized protein MRGPRG-AS1 (b, m, t, x)	499.35		x	
Q9Y3T6	R3H and coiled-coil domain-containing protein 1 (b, m, t, u)	120			x
P63244	Receptor of activated protein C kinase 1 (b, m, p, r, w)	248.8		x	
Q14D33	Receptor-transporting protein 5 (b, m, r, u, w)	1922.19			x
Q13332	Receptor-type tyrosine-protein phosphatase S (b, m, r, u, w)	259.81			x
A0A1B0GV24	Renin receptor (b, m, t, x)	473.62	x		
K7EKT5	Retinol dehydrogenase 8 (Fragment) (b, m, t, x)	452.15		x	
J3KPQ4	Rho GTPase activating protein 9_ isoform CRA_a (e, m, t, u)	289.79			x
Q9BRR9	Rho GTPase-activating protein 9 (a, m, n, u)	289.79			x
Q9H920	RING finger protein 121 (b, m, r, w)	463.58	x		
Q9Y2P8	RNA 3'-terminal phosphate cyclase-like protein (b, m, p, w)	326.89		x	
Q9Y5B0	RNA polymerase II subunit A C- terminal domain phosphatase (b, m, p, w)	190.24		x	
P02810	Salivary acidic proline-rich phosphoprotein 1/2 (b, d, h, l, o, u, v)	33240.95	x	x	x
Q53EL9	Seizure protein 6 homolog (b, m, s, u)	331.82			x
P02768	Serum albumin (a, b, c, g, o, u, w)	4642.4		x	x
Q9C0A6	SET domain-containing protein 5 (b, m, t, x)	208.86		x	
H3BUN7	SH2B adapter protein 1 (Fragment) (b, m, t, x)	364.32		x	
Q15005	Signal peptidase complex subunit 2 (b, m, r, x)	1064.88			x
Q9UBC9	Small proline-rich protein 3 (b, d, m, r, x)	366.05			x
Q9UP95	Solute carrier family 12 member 4 (a, m, r, u)	405.31			x
Q8NBI5	Solute carrier family 43 member 3 (a, m, r, u)	247.19			x
Q9BRW5	SP2 protein (b, m, p, x)	632.74		x	
O15020	Spectrin beta chain_ non-erythrocytic 2 (d, m, r, w)	247.55			x
Q96R06	Sperm-associated antigen 5 (b, m, n, p, q, u, w)	281.93		x	
Q7Z6I5	Spermatogenesis-associated protein 12 (b, m, n, p, q, u, w)	276.69		x	
Q5T0L3	Spermatogenesis-associated protein 46 (b, m, n, p, q, u, w)	516.32			x

Q8WXA9	Splicing regulatory glutamine/lysine-rich protein 1 (b, m, p, u, w)	229.99			x
A4QPE4	SPTBN2 protein 9 (b, m, r, w)	239.45			x
P02808	Statherin (b, e, i, l, o, u)	30038.16	x	x	x
P02814	Submaxillary gland androgen-regulated protein 3B (a, g, o, u, w)	108607	x	x	x
P78524	Suppression of tumorigenicity 5 protein (e, m, t, x)	474.6		x	
Q6UWP8	Suprabasin (b, m, o, x)	283.61		x	
Q8IYJ3	Synaptotagmin-like protein 1 (b, m, t, x)	1623.26		x	
Q9BQ61	Telomerase RNA component interacting RNase (b, m, t, x)	703.74		x	
E9PJK1	Tetraspanin (b, m, t, x)	727.88			x
A0A1B0GVH1	Transcription factor Sp2 (Fragment) (b, m, t, x)	632.74		x	
A0A0A0MR82	Transmembrane protease serine (e, m, o, x)	413.33	x		
Q6ZMR5	Transmembrane protease serine 11A (e, m, o, x)	413.33	x		
Q9H0C3	Transmembrane protein 117 (e, m, o, x)	288.54		x	
P07437	Tubulin beta chain (b, d, m, n, q, u, w)	318.98			x
Q13885	Tubulin beta-2A chain (b, d, m, n, q, u, w)	318.98			x
Q9BVA1	Tubulin beta-2B chain (b, d, m, n, q, u, w)	318.98			x
P04350	Tubulin beta-4A chain (b, d, m, n, q, u, w)	318.98			x
P68371	Tubulin beta-4B chain (b, d, m, n, q, u, w)	318.98			x
D6R980	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 D3 (b, m, r, w)	840.56	x		
A0A087WZY1	Uncharacterized protein (m, t, x)	33240.95	x		x
A0A2R8Y7X9	Uncharacterized protein (m, t, x)	355.09	x		
A0A087WZY1	Uncharacterized protein (m, t, x)	33240.95	x		x
H3BMM5	Uncharacterized protein (m, t, x)	222.74			x
E9PMD0	Uncharacterized protein (Fragment) (m, t, x)	240.06		x	
H3BQ85	Uncharacterized protein (Fragment) (m, t, x)	669.46		x	
J3KNI2	UPF0598 protein C8orf82 (m, t, x)	925.66		x	
P46939	Utrophin (b, m, r, w)	636.49		x	
Q96AX1	Vacuolar protein sorting-associated protein 33A (b, m, t, x)	222.74			x
A0A087WUX4	Voltage-dependent L-type calcium channel subunit alpha-1C (Fragment) (b, m, t, x)	264.58			x
Q8WWM1	X antigen family member 5 (b, m, t, x)	907.62		x	
Q92536	Y+L amino acid transporter 2 (b, m, t, x)	1854.35		x	
A2RRC6	ZFH2 protein (b, m, t, x)	305.52			x

A0A1W2PP20	Zinc finger and SCAN domain-containing protein 30 (a, c, d, m, p, u)	414.66	x		
A0A087X0K5	Zinc finger CCHC domain-containing protein 4 (a, c, d, m, p, u)	679.34		x	
Q7Z3T8	Zinc finger FYVE domain-containing protein 16 (a, c, d, m, p, u)	598.99			x
G3V5D6	Zinc finger FYVE domain-containing protein 21 (a, c, d, m, p, u)	301.29			x
Q9C0A1	Zinc finger homeobox protein 2 (a, c, d, m, p, u)	331.85			x
P52747	Zinc finger protein 143 (a, c, d, m, p, u)	835.62	x		
Q12901	Zinc finger protein 155 (a, c, d, m, p, u)	278.11			x
Q9UK13	Zinc finger protein 221 (a, c, d, m, p, u)	280.33			x
Q8TAF7	Zinc finger protein 461 (a, c, d, m, p, u)	556.01			x
Q14966	Zinc finger protein 638 (a, c, d, m, p, u)	351.52		x	
Q96H86	Zinc finger protein 764 (a, c, d, m, p, u)	669.46		x	
Q9H7M6	Zinc finger SWIM domain-containing protein 4 (a, c, d, m, p, u)	293.69			x
P25311	Zinc-alpha-2-glycoprotein (a, b, g, o, u, w)	3259.34		x	x
Q96DA0	Zymogen granule protein 16 homolog B (b, m, o, u)	2067.99		x	x

As proteínas destacadas em negrito são típicas da PAE. As proteínas foram classificadas de acordo com: Função Geral: a) metabolismo; b) processo biológico; c) transporte; d) estrutura; e) vias de informação; f) miscelânea. Função na PAE: g) metabolismo; h) regeneração tecidual; i) antimicrobiano; j) resposta imune; k) lubrificação; l) biomineralização; m) função biológica desconhecida. Origem: n) origem citoplasmática; o) origem extracelular; p) origem do núcleo; q) origem do citoesqueleto; r) origem intracelular; s) origem da membrana; t) origem proteica desconhecida. Interação: u) interação proteína/proteína; v) ligação cálcio/fosfato; w) outra interação molecular; x) interação molecular desconhecida.

Três análises comparativas foram realizadas para avaliar a diferença na expressão: *in vitro versus in situ*, *in vitro versus in vivo* e *in situ versus in vivo* (usando $p < 0,05$ para proteínas subreguladas e $1 - p > 0,95$ para proteínas superreguladas).

4.5.2 Diferença de expressão das proteínas entre *in vitro versus in situ*

Na comparação *in vitro versus in situ*, apenas 2 proteínas foram aumentadas na condição *in vitro*, sendo a estaterina a mais importante da composição da PAE, enquanto 23 proteínas foram reduzidas na condição *in vitro*, incluindo duas isoformas de alfa-amilase, duas isoformas de PRP salivar básico, três isoformas de cistatina, histatina-1, lisozima C, mucina-7, alfa-amilase pancreática, proteína 4 rica em prolina, fosfoproteína ½ rica em prolina ácida salivar e proteína 3B regulada por androgênio da glândula submaxilar (Tabela 3).

Tabela 3. Comparação entre as condições *in vitro* e *in situ*. Análise da diferença de expressão das proteínas identificadas na PAE

Número de acesso	Nome da proteína	Ratio:		P:	
		<i>In vitro</i>	<i>In situ</i>	<i>In vitro</i>	<i>In situ</i>
A0A0B4J2F3	Forkhead box protein P1	2.22		1.00	
P02808	Statherin	1.37		1.00	
O75376	Nuclear receptor corepressor 1	1.06		0.74	
P62736	Actin_ aortic smooth muscle	0.37		0.01	
P60709	Actin_ cytoplasmic 1	0.37		0.01	
P63261	Actin_ cytoplasmic 2	0.36		0.01	
P68032	Actin_ alpha cardiac muscle 1	0.35		0.01	
A5A3E0	POTE ankyrin domain family member F	0.35		0.01	
P68133	Actin_ alpha skeletal muscle	0.34		0.01	
Q6S8J3	POTE ankyrin domain family member E	0.34		0.01	
P63267	Actin_ gamma-enteric smooth muscle	0.31		0.01	
P02812	Basic salivary proline-rich protein 2	0.17		0.01	
P02810	Salivary acidic proline-rich phosphoprotein 1/2	0.15		0.01	
A0A0A0MT31	Proline-rich protein 4	0.15		0.01	
P02814	Submaxillary gland androgen-regulated protein 3B	0.11		0.01	
P04280	Basic salivary proline-rich protein 1	0.10		0.01	
P01036	Cystatin-S	0.10		0.01	
P09228	Cystatin-SA	0.10		0.01	
P01037	Cystatin-SN	0.10		0.01	
P61626	Lysozyme C	0.07		0.01	
P15515	Histatin-1	0.05		0.01	
Q8TAX7	Mucin-7	0.03		0.01	
P04746	Pancreatic alpha-amylase	0.01		0.01	
P04745	Alpha-amylase 1	0.01		0.01	
P19961	Alpha-amylase 2B	0.01		0.01	

4.5.3 Diferença de expressão das proteínas *in vitro* versus *in vivo*

Quando a condição *in vitro* foi comparada com a condição *in vivo*, foram identificadas 9 proteínas aumentadas na primeira condição, incluindo 5 isoformas de hemoglobina e a estaterina. Além disso, 23 proteínas foram diminuídas na condição *in vitro*, dentre elas duas isoformas de alfa-amilase, duas isoformas de PRP salivar básica, três isoformas de cistatina, histatina-1, lisozima C, mucina-7, alfa-amilase pancreática, Proteína 4 rica em prolina, fosfoproteína 1/2 rica em prolina ácida salivar e proteína 3B regulada por andrógenos da glândula submaxilar (Tabela 4).

Tabela 4. Comparação entre as condições *in vitro* e *in vivo*. Análise da diferença de expressão das proteínas identificadas na PAE

Número de acesso	Nome da proteína	Ratio: <i>In vitro</i> : <i>In vivo</i>	P: <i>In vitro</i> : <i>In vivo</i>
Q8WX93	Palladin	2.82	0.98
Q9NYZ2	Mitoferrin-1	1.87	1.00
P02042	Hemoglobin subunit delta	1.68	0.99
P02100	Hemoglobin subunit epsilon	1.66	0.98
P69892	Hemoglobin subunit gamma-2	1.64	1.00
P69891	Hemoglobin subunit gamma-1	1.64	0.99
A0A2R8Y7X9	Uncharacterized protein	1.63	0.98
P68871	Hemoglobin subunit beta	1.61	1.00
P02808	Statherin	1.29	1.00
P02812	Basic salivary proline-rich protein 2	0.86	0.01
P04280	Basic salivary proline-rich protein 1	0.76	0.01
P02810	Salivary acidic proline-rich phosphoprotein 1/2	0.57	0.01
A0A087WZY1	Uncharacterized protein	0.45	0.01
A0A0A0MT31	Proline-rich protein 4	0.35	0.01
P02814	Submaxillary gland androgen-regulated protein 3B	0.28	0.01
A5A3E0	POTE ankyrin domain family member F	0.28	0.01
P68032	Actin_ alpha cardiac muscle 1	0.27	0.01
Q6S8J3	POTE ankyrin domain family member E	0.27	0.01
P68133	Actin_ alpha skeletal muscle	0.27	0.01
P63267	Actin_ gamma-enteric smooth muscle	0.26	0.01
P62736	Actin_ aortic smooth muscle	0.26	0.01
P60709	Actin_ cytoplasmic 1	0.23	0.01
P63261	Actin_ cytoplasmic 2	0.23	0.01
P01036	Cystatin-S	0.21	0.01
P09228	Cystatin-SA	0.15	0.01
P01037	Cystatin-SN	0.15	0.01
P15515	Histatin-1	0.11	0.01
P04746	Pancreatic alpha-amylase	0.09	0.01
Q8TAX7	Mucin-7	0.08	0.01
P04745	Alpha-amylase 1	0.03	0.01
P19961	Alpha-amylase 2B	0.03	0.01
P61626	Lysozyme C	0.02	0.01

4.5.4 Diferença de expressão das proteínas entre *in situ* versus *in vivo*

Comparando as condições *in situ* versus *in vivo*, foram encontradas 38 proteínas aumentadas na condição *in situ*, dentre elas duas isoformas de alfa-amilase, duas isoformas de PRP salivar básica, quatro isoformas de cistatina, duas isoformas de histatina-1, nove isoformas

de imunoglobulina, duas isoformas de lisozima, mucina-7, alfa-amilase pancreática, proteína S100-A9, proteína 3B regulada por andrógeno da glândula submaxilar, duas isoformas de proteína rica em prolina e fosfoproteína ácida salivar rica em prolina ½. Além disso, 13 proteínas foram reduzidas, sendo uma delas a estaterina (Tabela 5).

Tabela 5. Comparação entre as condições *in situ* e *in vivo*. Análise da diferença de expressão das proteínas identificadas na PAE

Número de acesso	Nome da proteína	Ratio <i>In situ: In vivo</i>	P: <i>In situ: In vivo</i>
P04745	Alpha-amylase 1	5.25	1.00
P19961	Alpha-amylase 2B	5.25	1.00
P04746	Pancreatic alpha-amylase	5.00	1.00
Q6MZM9	Proline-rich protein 27	4.75	0.98
P04280	Basic salivary proline-rich protein 1	4.30	1.00
P01833	Polymeric immunoglobulin receptor	3.42	1.00
P02812	Basic salivary proline-rich protein 2	3.28	1.00
Q8TAX7	Mucin-7	2.82	1.00
P04792	Heat shock protein beta-1	2.58	1.00
P02810	Salivary acidic proline-rich phosphoprotein 1/2	2.50	0.99
A0A0A0MT31	Proline-rich protein 4	2.45	0.99
P01876	Immunoglobulin heavy constant alpha 1	2.43	1.00
P01834	Immunoglobulin kappa constant	2.38	1.00
Q96DA0	Zymogen granule protein 16 homolog B	2.33	1.00
P19013	Keratin_ type II cytoskeletal 4	2.24	1.00
P01877	Immunoglobulin heavy constant alpha 2	2.20	1.00
P06702	Protein S100-A9	2.15	1.00
P02814	Submaxillary gland androgen-regulated protein 3B	2.11	1.00
P28325	Cystatin-D	2.03	1.00
P15516	Histatin-3	2.03	0.99
P0CF74	Immunoglobulin lambda constant 6	1.95	1.00
P27482	Calmodulin-like protein 3	1.87	1.00
P01591	Immunoglobulin J chain	1.85	1.00
P61626	Lysozyme C	1.85	1.00
P15515	Histatin-1	1.84	1.00
P0CG04	Immunoglobulin lambda constant 1	1.84	1.00
P04083	Annexin A1	1.63	1.00
Q6P5S2	Protein LEG1 homolog	1.58	1.00
P0DOY3	Immunoglobulin lambda constant 3	1.58	0.99
P12273	Prolactin-inducible protein	1.53	1.00
P0DOY2	Immunoglobulin lambda constant 2	1.50	1.00
P01036	Cystatin-S	1.46	1.00

P01037	Cystatin-SN	1.44	1.00
B9A064	Immunoglobulin lambda-like polypeptide 5	1.39	1.00
F8VV32	Lysozyme	1.34	1.00
C9JKR2	Albumin_ isoform CRA_k	1.30	1.00
P09228	Cystatin-SA	1.30	1.00
P02768	Serum albumin	1.23	1.00
P25311	Zinc-alpha-2-glycoprotein	0.86	0.01
P02808	Statherin	0.80	0.01
P01857	Immunoglobulin heavy constant gamma 1	0.76	0.01
P60709	Actin_ cytoplasmic 1	0.71	0.01
P13646	Keratin_ type I cytoskeletal 13	0.71	0.01
P68133	Actin_ alpha skeletal muscle	0.70	0.01
P62736	Actin_ aortic smooth muscle	0.70	0.01
P63261	Actin_ cytoplasmic 2	0.70	0.01
P63267	Actin_ gamma-enteric smooth muscle	0.68	0.01
Q6S8J3	POTE ankyrin domain family member E	0.67	0.01
P0CG39	POTE ankyrin domain family member J	0.66	0.01
A5A3E0	POTE ankyrin domain family member F	0.66	0.01
P0CG38	POTE ankyrin domain family member I	0.55	0.01

4.6 DISCUSSÃO

O principal objetivo do presente estudo foi fornecer a base para a comparação apropriada entre as três condições experimentais: *in vitro*, *in situ* e *in vivo*. No entanto, algumas considerações são importantes e podem explicar os resultados distintos encontrados, quando diferentes delineamentos foram empregados. A PAE *in vitro* foi formada com saliva não estimulada, enquanto as películas *in situ* e *in vivo* foram formadas com saliva diretamente da cavidade oral. A última condição poderia ter um pouco mais de influência do fluido crevicular, mas provavelmente esta é uma porção pequena que se encontra na PAE, localizada principalmente na face vestibular dos dentes. Porém, no presente estudo a PAE foi coletada no terço médio da superfície do dente. Portanto, a influência do fluido crevicular no presente experimento foi provavelmente menor. Além disso, algumas proteínas da película são originadas do fluido crevicular, como a serotransferrina (ODANAKA *et al.*, 2020), a qual não foi identificada no presente estudo.

Um aspecto fundamental foi que os mesmos participantes estiveram presentes nas três condições experimentais. Isso permitiu uma diminuição das variações em função da composição da saliva. Além disso, todos os experimentos foram realizados no período da manhã (incluindo coleta de saliva para o experimento *in vitro*), reduzindo, assim, as diferenças circadianas e diminuindo as variações entre as condições. Outro ponto importante foi que o local da coleta da PAE (na condição *in vivo*) correspondeu exatamente ao mesmo local onde

estavam localizados os espécimes de esmalte no experimento *in situ*, o que permitiu menores variações no perfil proteômico devido às diferenças de localização dentro da cavidade oral do indivíduo (VENTURA *et al.*, 2017). Na condição *in vivo*, a PAE foi coletada dos próprios dentes do participante, por outro lado, nas condições *in vitro* e *in situ*, a PAE foi coletada de espécimes de esmalte, podendo-se argumentar que os diferentes dentes poderiam ter películas diferentes. Entretanto, um estudo demonstrou que não há diferenças no perfil proteômico da PAE entre esmalte humano e bovino (PELÁ *et al.*, 2018). Portanto, não se podem esperar diferenças no presente estudo.

É importante abordar uma limitação da condição *in vitro*, na qual o fluxo salivar natural é praticamente impossível de se reproduzir e pode afetar a quantidade de proteínas recuperadas durante a coleta da PAE. Para contornar essa limitação, nossa condição *in vitro* foi caracterizada pela troca da saliva a cada 30 min, como apresentado no capítulo anterior (PELÁ *et al.*, 2020a). Nesta condição experimental do presente estudo, a recuperação de proteína foi cerca de 9 µg de proteínas, quantidade suficiente para a análise proteômica, a qual permitiu a identificação de 66 proteínas. Esse valor é superior ao relatado no estudo de Siqueira (SIQUEIRA *et al.*, 2012b) (45 proteínas) e no estudo do capítulo anterior (55 proteínas) (PELÁ *et al.*, 2020a). Além disso, dessas 66 proteínas, foram identificadas 15 proteínas tipicamente encontradas na PAE. É importante destacar que os resultados da quantificação obtida pelo método de Bradford demonstraram diferença entre os grupos. No entanto, todas as amostras foram calculadas e ajustadas para a mesma concentração (8,88 µg) antes de serem submetidas à análise proteômica, permitindo uma comparação real entre os grupos.

Com relação à condição *in situ*, foram identificadas 174 proteínas, este valor é considerado muito superior ao obtido em um experimento, o qual identificou 37 proteínas (PELÁ *et al.*, 2018). Isso pode ser atribuído ao maior número de espécimes de esmalte empregado na presente condição, em comparação ao estudo anterior (108 *versus* 54 espécimes). Em um recente estudo *in situ*, 498 proteínas foram identificadas em amostras de películas individuais formadas em esmalte bovino. O maior número de proteínas identificadas é devido à área superficial ser muito maior (cerca de 8 cm²) e pelo fato de a película ser coletada com soluções que não podem ser empregadas na condição clínica (TRAUTMANN *et al.*, 2020). O número total de proteínas identificadas *in situ* foi praticamente idêntico ao *in vivo* (170 proteínas), quantidade que foi inferior ao relatado por Ventura *et al* (VENTURA *et al.*, 2017). Porém, neste último estudo, a PAE foi coletada de todos os dentes dos participantes, enquanto no presente estudo a PAE foi coletada apenas nos locais selecionados.

Na condição *in vitro*, foi identificado um número consideravelmente menor de proteínas na PAE em comparação com as condições *in situ* e *in vivo* (Figura 3), além disso, várias proteínas identificadas *in situ* e *in vivo* são proteínas intracelulares, cuja função dentro da PAE não é conhecida até o momento. Além disso, 23 proteínas foram identificadas em comum às três condições, das quais 15 proteínas são típicas da PAE, apresentando importantes funções neste integumento. Entretanto, na condição *in vitro*, algumas importantes proteínas típicas da PAE não foram identificadas, tais como onze isoformas da imunoglobulina (participa na resposta de defesa à bactéria), histatina-3 (exibe atividades antibacteriana e antifúngica), duas isoformas da proteína S100 (ligação de cálcio e zinco, além da função antibacteriana) e Lisozima (atua como componente antibacteriano). Esta última proteína tem a capacidade de degradar peptidoglicanos bacterianos, resultando em um forte potencial anticariogênico (CHU *et al.*, 2018). A ausência dessas proteínas pode influenciar em estudos relacionados à cárie dentária. Assim, do ponto de vista qualitativo, a condição *in vitro* não identificou proteínas importantes da PAE, sugerindo que esta condição não é completamente reprodutível em relação à condição *in vivo*. Em contraste, a condição *in situ* mostrou uma semelhança (nas proteínas típicas da PAE) com a condição *in vivo*.

Do ponto de vista quantitativo, diferenças relevantes também foram detectadas entre as diferentes condições experimentais, utilizando a expressão para proteínas subreguladas e superreguladas. Quando a condição *in vitro* foi comparada com as condições *in situ* e *in vivo*, houve uma grande redução de proteínas importantes, dentre elas, as cistatinas, mucina-7 e alfa-amilase, as quais podem apresentar um impacto em estudos envolvendo cárie e erosão dentária, onde se avalia o papel protetor dessas proteínas (DELECRODE *et al.*, 2015a; DELECRODE *et al.*, 2015b) (Tabelas 3 e 4). Com relação ao aumento da estaterina na condição *in vitro*, vale a pena mencionar que foi apenas 37% em relação à condição *in situ*, enquanto todas as outras proteínas reduzidas (na condição *in vitro* em relação à *in situ*) apresentaram uma redução superior a 50%. Além disso, ao comparar as condições *in vitro* e *in vivo*, o aumento de estaterina foi ainda menor (29%), já com relação às diferentes isoformas de hemoglobina, o aumento foi de 61 a 68% na condição *in vitro*. Entretanto, houve grandes reduções das proteínas importantes da PAE, como por exemplo, cistatina, mucina-7, alfa-amilase e lisozima C. Esses resultados, possivelmente, indicam que o desempenho dos tratamentos com essas proteínas na condição *in vitro* pode estar subestimado em relação às condições *in situ* e *in vivo*, uma vez que os tratamentos visam a aumentar as concentrações dessas proteínas na PAE.

Por outro lado, quando a condição *in situ* foi comparada (por diferença de expressão) com a condição *in vivo*, foi observado o contrário, ou seja, houve um grande aumento de

proteínas importantes da PAE na condição *in situ*, dentre elas a alfa-amilase, várias isoformas de PRPs, cistatinas, histatinas, proteína S100 e lisozima (Tabela 5). Isso implica que os tratamentos avaliando essas proteínas na condição *in situ* podem ser altamente comparáveis com a condição *in vivo*.

Com base em nossos resultados, a hipótese nula foi rejeitada. As diferenças entre as condições experimentais podem interferir na extrapolação dos resultados obtidos em estudos *in vitro* para as demais condições (*in situ* e *in vivo*), no campo da erosão dentária e do DDE. Este resultado garante uma nova perspectiva sobre estudos com aplicações clínicas envolvendo a PAE, uma vez que os procedimentos preventivos e terapêuticos relacionados à erosão dentária empregados no momento são baseados em evidências obtidas de estudos conduzidos *in vitro* ou, na melhor das hipóteses *in situ*, devido à falta de variáveis de resposta para avaliar clinicamente a erosão dentária e o DDE. Também é importante ressaltar que, em algumas situações, por exemplo, quando se deseja avaliar o impacto protetor que a PAE em si, ou submetida a alguma modificação (na área da erosão dentária), as condições *in vitro* e *in situ* são necessárias, de forma que se possa após a coleta da PAE (para análise proteômica), ter acesso aos espécimes de esmalte para avaliação da perda mineral inicial (por teste de dureza) ou mais avançada (por teste de perfilometria). Além disso, a ausência de algumas proteínas relacionadas à atividade bacteriana pode ter fortes impactos em estudos *in vitro* relacionados à cárie dentária.

4.7 CONCLUSÃO

Portanto, todos os perfis proteômicos (qualitativo e quantitativo) foram diferentes, principalmente no que diz respeito às proteínas típicas da PAE na condição *in vitro* quando comparada às condições *in situ* e *in vivo*. Em adição, estes resultados obtidos servirão como base para a compreensão dos próximos capítulos da presente tese, os quais apresentam os tratamentos envolvendo proteínas e peptídeos contra a erosão dentária inicial ou DDE.

A decorative flourish consisting of a thin, dark line that forms a large, elegant loop on the left side, a long horizontal sweep across the middle, and another large loop on the right side. The number '5.' and the text 'CAPÍTULO 3' are positioned within the left loop.

5. **CAPÍTULO 3**

**ENGENHARIA DE PELÍCULA ADQUIRIDA COM PROTEÍNAS/PEPTÍDEOS:
MECANISMO DE AÇÃO NA SUPERFÍCIE NATIVA DO ESMALTE HUMANO *IN*
*VITRO***

5.1 INTRODUÇÃO

O terceiro capítulo encontra-se publicado no *Journal of Dentistry*, no ano de 2021. Este estudo está intitulado “Acquired pellicle engineering with proteins/peptides: Mechanism of action on native human enamel surface”. A autoria está representada na seguinte ordem: Vinícius Taioqui Pelá, Marília Afonso Rabelo Buzalaf, Samira Helena Niemeyer, Tommy Baumann, Flávio Henrique Silva, Danyelle Toyama, Edson Crusca, Reinaldo Marchetto, Adrian Lussi, Thiago Saads Carvalho (Ver a página inicial do artigo em APÊNDICE 3).

A interação contínua da superfície dentária com os desafios químicos (por ácidos) causa a perda de tecido dentário. Este processo é conhecido como erosão dentária (SHELLIS *et al.*, 2011). Os ácidos causadores deste desgaste podem estar relacionados à dieta (extrínseca) (BARBOUR e LUSSI, 2014) ou ao conteúdo gástrico do indivíduo (intrínseco) (MOAZZEZ e BARTLETT, 2014). Vários fatores relacionados ao paciente estão ligados à erosão dentária, tais como fatores biológicos, nutricionais e comportamentais (LUSSI e CARVALHO, 2014).

A saliva é considerada um dos mais importantes fatores biológicos, constituindo um papel protetor devido às suas inúmeras funções (HANNIG e BALZ, 1999; HANNIG e BALZ, 2001; VAN *et al.*, 2004; HARA *et al.*, 2006). Alguns exemplos clássicos podem ser mencionados, tais como, a capacidade de diluir e tamponar os ácidos, bem como fornecer íons para remineralização. Também a presença da saliva na cavidade oral contribui na formação da PAE (PEDERSEN e BELSTRØM, 2019), a qual é caracterizada como uma fina camada orgânica, livre de bactérias, formada por proteínas predominantemente salivares que se ligam a todas as superfícies expostas da estrutura dentária (DAWES *et al.*, 1963). A PAE proporciona uma barreira de difusão por meio da redução do contato direto dos ácidos com a superfície do dente, retardando o processo de erosão dentária (VUKOSAVLJEVIC *et al.*, 2014; CHAWHUAVEANG *et al.*, 2021).

Além das efetividades naturais desta camada orgânica, uma nova vertente está ganhando força por meio da incorporação de proteínas na PAE; esse procedimento está sendo sugerido como uma alternativa para proteger (ainda mais) os dentes contra a erosão dentária (CHEAIB e LUSSI, 2011; VUKOSAVLJEVIC *et al.*, 2014; CARVALHO *et al.*, 2020). Por meio de ferramentas proteômicas, alguns estudos identificaram as proteínas que permaneceram na PAE após exposição aos ácidos, sugerindo resistência a ataques ácidos; exemplos dessas proteínas são: cistatina (DELECRODE *et al.*, 2015a; DELECRODE *et al.*, 2015b), estaterina (TAIRA *et al.*, 2018) e hemoglobina (MARTINI *et al.*, 2019).

Diante disso, essas proteínas se tornam opções viáveis para serem utilizadas em produtos de saúde bucal, com o intuito de fortalecer a PAE e ajudar a proteger os dentes contra ataques ácidos. Ainda, ao considerar a aplicação clínica dessas proteínas, é importante ressaltar que um dos fatores que precisa ser levado em consideração é o seu custo de aquisição. Nesse sentido, o uso de cistatina humana não se torna viável. Entretanto, para superar essa limitação, uma nova cistatina derivada da cana-de-açúcar foi produzida recombinantemente e denominada, CaneCPI-5 (SANTIAGO *et al.*, 2017).

Esta proteína tem se mostrado solúvel quando produzida em um sistema de expressão bacteriana (*Escherichia coli*), o que facilita sua produção e purificação a baixo custo (SANTIAGO *et al.*, 2017). Além disso, o estudo mostrou que o tratamento com CaneCPI-5 pode modificar a PAE e proteger os dentes contra a erosão inicial *in vitro*. Esta metodologia foi realizada com a superfície polida do esmalte e avaliada pela análise de microdureza. Em adição, a microscopia de força atômica demonstrou que a CaneCPI-5 pode se ligar fortemente ao esmalte (SANTIAGO *et al.*, 2017).

Da mesma forma, os custos do uso da estaterina natural seriam altos. Novamente, para superar esta limitação, um peptídeo foi desenvolvido recentemente contendo os 15 resíduos N-terminais de Estaterina. Além disso, o tratamento com este peptídeo (em forma de solução) demonstrou resultados promissores para proteção contra a erosão inicial *in vitro* (Taira *et al.*, 2020), bem como o tratamento com hemoglobina comercial (MARTINI *et al.*, 2020). Ambas proteínas protegeram contra desafios erosivos com ácido clorídrico (simulando erosão intrínseca).

Nesse sentido, os tratamentos mencionados acima têm potencial para engenharia de película adquirida, podendo modificar a PAE e proteger os dentes contra os desafios ácidos. Até o momento, todos os estudos envolvendo essas proteínas/peptídeos (CaneCPI-5, hemoglobina e o peptídeo de estaterina) foram realizados em esmalte polido, devido às técnicas analíticas de avaliação do desgaste. No entanto, o uso de superfícies de esmalte nativo (sem polimento) está mais relacionado à situação clínica, podendo ser investigado com o uso de um dispositivo de reflexão (RAKHMATULLINA *et al.*, 2013; CARVALHO *et al.*, 2016a; CARVALHO *et al.*, 2016b), o qual está sendo proposto neste capítulo.

5.2 OBJETIVOS

Os objetivos do presente capítulo foram avaliar o efeito protetor das Proteínas/Peptídeos (CaneCPI-5, hemoglobina e o peptídeo de estaterina, isoladamente ou em combinação) contra a erosão dentária inicial *in vitro*, bem como elucidar o mecanismo de ação destes tratamentos

quando aplicados diretamente na superfície do esmalte nativo ou por meio da engenharia de película adquirida.

5.3 HIPÓTESES NULAS

As seguintes hipóteses nulas foram testadas: 1) não há diferença entre os tratamentos na ausência da PAE (quando atuam diretamente na superfície do esmalte nativo); 2) não há diferença entre os tratamentos na presença da PAE (com modificação da PAE); 3) a combinação de todas as proteínas/peptídeos não difere dos tratamentos isolados.

5.4 MATERIAL E MÉTODOS

5.4.1 Seleção dos participantes e coleta da saliva estimulada

Foram selecionados nove adultos (idade média de 33 anos) de ambos os gêneros (5 homens e 4 mulheres) com bom estado de saúde geral. Os critérios de exclusão foram: pacientes fumantes, gestantes, com doenças sistêmicas ou em uso de medicações de longa duração. Além disso, os critérios específicos bucais também foram levados em consideração, excluindo pacientes com cárie ativa, presença de DDE, doença periodontal, fluxo salivar anormal (considerando o normal para saliva não estimulada $> 0,3$ mL/min e saliva estimulada $> 1,0$ mL/min).

Para o procedimento de coleta da saliva, os participantes foram orientados a não comer ou beber por 2 h antes da coleta da saliva. A saliva total foi coletada entre 9:00 e 10:00 h da manhã, mastigando um *parafilm* por 10 min em frascos resfriados com gelo. Posteriormente, a saliva foi agrupada (*pool*: para evitar os efeitos idiossincráticos) e centrifugada (14.000 g por 20 min a 4 °C) (SANTIAGO *et al.*, 2017). Os sobrenadantes foram separados do precipitado, aliquotados e armazenados até o dia do experimento a -80 °C. Devido ao *pool* da saliva, o comitê de ética local considera que a saliva de cada indivíduo não pode ser rastreada. Isso categoriza como “irreversivelmente anônima”. Nesse caso, nenhuma aprovação do comitê se tornou necessária (Kantonale Ethikkommission: KEK, Switzerland), uma vez que este estudo foi desenvolvido na Universidade de Berna, Suíça. Mesmo assim, os participantes forneceram seu consentimento, informando o uso de sua saliva para este estudo

5.4.2 Preparo dos espécimes de esmalte humano nativo

Foram utilizados terceiros molares humanos. Inicialmente, os dentes foram inspecionados visualmente para avaliar a presença de cáries, manchas e rachaduras por meio de

um microscópio (Leica, M420) conectado a uma câmera (Leica, DFC495). Um total de 170 espécimes de esmalte humano foram preparados a partir da superfície vestibular das coroas, utilizando dois discos diamantados (ExtexCorp., Enfield, CT, EUA) e um espaçador de 4 mm acoplado a uma máquina de corte de precisão (ISOMET Low Speed Saw Buehler, Lake Bluff, Illinois, EUA) para obter amostras padronizadas (4 × 4 mm). Além disso, a altura foi padronizada em 2 mm por meio de polimento da superfície dentinária. Enquanto a superfície do esmalte nativo permaneceu inalterada, todos os outros lados foram protegidos com esmalte de unha, permanecendo exposta apenas a superfície de interesse do esmalte. Posteriormente, os espécimes foram limpos com o ultrassom, utilizando água deionizada por 7 min a 25 °C.

Em seguida, os espécimes foram armazenados com controle de umidade (gaze úmida) a 4 °C até o momento do experimento. Como descrito anteriormente sobre a saliva, os dentes também foram adquiridos a partir de um biobanco agrupado e aleatorizados, onde o material biológico é “irreversivelmente anônimo” e não rastreável a qualquer paciente/participante. De acordo com o comitê de ética local, tais amostras não precisam de consentimento formal por escrito, nem a aprovação prévia do comitê de ética (Kantonale Ethikkommission: KEK, Switzerland).

5.4.3 Aquisição das proteínas e peptídeo para os tratamentos

A CaneCPI-5 foi produzida de forma recombinante em *E. coli* (SANTIAGO *et al.*, 2017) na Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, São Paulo, Brasil. Resumidamente, a proteína expressa foi purificada a partir da fração solúvel de culturas bacteriana induzidas por IPTG (Isopropil-beta-D-Tiogalactosídeo), submetida à centrifugação e a sonicação. Em seguida, a purificação foi feita por cromatografia de afinidade, utilizando colunas contendo resina de níquel (Ni-NTA - Superflow - Qiagen) (SOARES-COSTA *et al.*, 2002; SANTIAGO *et al.*, 2017).

A Hemoglobina humana foi obtida da Sigma (catálogo: H7379 - Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA) (MARTINI *et al.*, 2020).

O peptídeo derivado da Estaterina, contendo os 15 resíduos N-terminais (DpSpSEEKFLRRIGRFG, onde “p” significa fosforilação em serina - 2 e 3 fosforilada) foi sintetizado pelo método de fase sólida (AMBLARD *et al.*, 2005), de acordo com um protocolo padrão, no qual foi utilizado um fluorenilmetoxicarbonil protetor (Fmoc) (como protetor dos grupos α-amino e derivados t-butil) com a finalidade de proteger as cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos trifuncionais (CHAN e WHITE, 2000). Depois, os peptídeos foram purificados por cromatografia líquida de alta eficiência, utilizando coluna C18. Por fim, eles foram

caracterizados através da determinação da massa molecular (CHAN e WHITE, 2000; TAIRA *et al.*, 2020) Este peptídeo foi desenvolvido na UNESP de Araraquara, Araraquara, São Paulo, Brasil.

5.4.4 Grupos e procedimentos experimentais

Os espécimes de esmalte foram distribuídos (determinadas por números aleatoriamente computadorizados) em 10 grupos (n=17/grupo), de acordo com os grupos de tratamento e com os procedimentos experimentais: mecanismo de ação das proteínas/peptídeos atuando diretamente na superfície do esmalte sem a formação da PAE (sem PAE; SPAE) ou mecanismo de ação sobre a PAE (com PAE; CPAE). Quatro grupos de tratamento foram usados para ambos os procedimentos e as concentrações de cada proteína/peptídeo foram determinadas de acordo com estudos anteriores: Controle (água deionizada, sem proteína/peptídeo, pH 7,9), CaneCPI-5 (0,1 mg/mL, pH 7,8) (SANTIAGO *et al.*, 2017), Hemoglobina (1 mg/mL, pH 6,3) (MARTINI *et al.*, 2020), peptídeo de Estaterina ($1,88 \times 10^{-5}$ M, pH 6,1) (TAIRA *et al.*, 2020). Todas as proteínas/peptídeos foram preparados em água. Em adição, dois grupos foram testados em amostras com PAE: peptídeo de Estaterina solubilizada em tampão fosfato (pH 7,1) e uma combinação das três proteínas/peptídeos (diluídas em água, pH 7,9; Combinação) (Figura 4).

Antes do experimento, todas as amostras foram lavadas (5 s) e secas (3 s). Em seguida, o *baseline* da intensidade de reflexão da superfície inicial (IRSi) foi medida em todas as amostras, usando um Reflectômetro portátil (RAKHMATULLINA *et al.*, 2013; CARVALHO *et al.*, 2016a; CARVALHO *et al.*, 2016b). Posteriormente, os espécimes foram submetidos aos tratamentos, de acordo com as soluções acima. Para isso, os espécimes foram imersos individualmente (250 μ L) em microtubos de 2 mL, contendo água ou solução de proteína/peptídeo, por 2 h a 37 °C, sob agitação de 70 rpm. Em seguida, os espécimes foram lavados com água deionizada (5 s) e secos com ar (3 s) (Figura 4).

Para estudar o mecanismo de ação diretamente na superfície do esmalte, os espécimes foram submetidos diretamente ao desafio erosivo (para simular o efeito do suco de laranja) em microtubos (1 mL, ácido cítrico 1%, pH 3,6, durante 2 min, a 25 °C, 70 rpm) e imediatamente os espécimes foram enxaguados com água deionizada (5 s) e secos com ar (3 s) (CARVALHO *et al.*, 2016b). O ácido cítrico foi armazenado a 4 °C para posterior análise do cálcio liberado no ácido cítrico. Estes procedimentos (tratamento com as proteínas/peptídeos e ácido) foram repetidos, totalizando 5 vezes (Figura 4).

Para os espécimes voltados para o mecanismo de ação na PAE, os seguintes passos foram realizados. Inicialmente, os espécimes foram submetidos aos tratamentos (com a solução

proteína/peptídeo, conforme descrito acima). Em seguida, os espécimes foram incubados individualmente em saliva humana em microtubos de 2 ml (250 µL, durante 2 h, a 37 °C, sob agitação de 70 rpm) para a formação da PAE. Imediatamente, os espécimes foram lavados com água deionizada (5 s) e secos com ar (3 s). Por fim, os espécimes foram submetidos ao desafio ácido, conforme descrito acima. Da mesma forma do mecanismo de ação diretamente na superfície do esmalte, os procedimentos voltados ao mecanismo de ação na PAE foram repetidos, totalizando 5 vezes (Figura 4).

Ao final do experimento, todos os espécimes foram submetidos individualmente a 1 mL de solução de hipoclorito de sódio a 3% (NaOCl) por 5 min, a 25 °C (para remover a camada remanescente da PAE (BREVIK *et al.*, 2013) e não interferir na análise final da intensidade de reflexão da superfície (IRSf)).

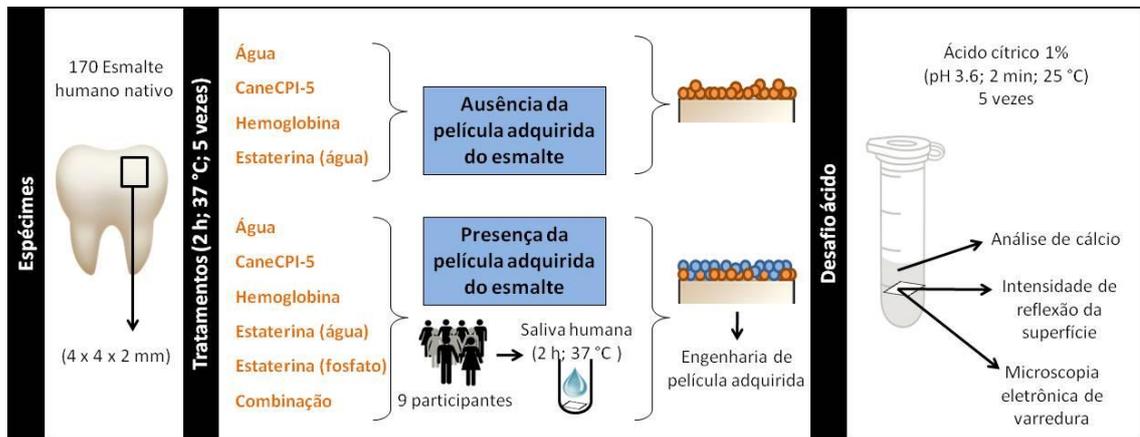


Figura 4. Esquema metodológico da presença ou ausência da PAE *in vitro*. Representação dos espécimes, grupos de tratamento, ausência ou presença da película adquirida, desafio ácido e diferentes métodos para a análise.

5.4.5 Relação da intensidade de reflexão da superfície (%IRS)

A intensidade de reflexão da superfície (IRS) foi realizada, usando um Reflectômetro portátil Optipen (RAKHMATULLINA *et al.*, 2013; CARVALHO *et al.*, 2016a; CARVALHO *et al.*, 2016b). Na análise inicial (IRSi) e na análise final (IRSf), os espécimes foram previamente lavados (5 s) e secos (3 s). Em seguida, a ponta do Reflectômetro foi colocada sobre a superfície do esmalte e inclinada em diferentes ângulos até se obter o maior ponto de reflexão. Para a análise estatística, foi utilizado o valor relativo do IRS (%IRS), calculado da seguinte forma: %IRS: $(IRSf / IRSi) \times 100$.

5.4.6 Análise do cálcio liberado no ácido cítrico (AC)

Após cada desafio erosivo, o ácido cítrico foi armazenado. Ao final do experimento, as alíquotas utilizadas para os 5 ciclos de cada amostra foram reunidas (totalizando 5 mL de ácido por amostra). Em seguida, o ácido foi analisado por um espectrômetro de absorção atômica (AAS; Analyst 400, Perkin Elmer Analytical Instruments, Waltham, MA, EUA). Nitrato de lantânio (0,5%, nitrato de lantânio hexahidratado: $\text{La}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) foi adicionado ao ácido cítrico para eliminar a interferência de outros íons (SCHLUETER *et al.*, 2011). Dessa forma, os valores das concentrações de cálcio foram utilizados para calcular a quantidade total de cálcio liberada por espécime de esmalte. Esses valores de cálcio foram normalizados para a área do esmalte. Para obter um resultado mais preciso, a área da superfície do esmalte foi medida, usando um microscópio de luz (Leica, M420) conectado a uma câmera (Leica, DFC495) e um *software* IM500. Assim, a quantidade total de cálcio liberada foi expressa em $\text{nmol de Ca}^{2+}/\text{mm}^2$ de esmalte (CARVALHO *et al.*, 2016a).

5.4.7 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Um espécime de cada grupo foi usado para obter micrografias em alta ampliação. Para isso, os espécimes foram revestidos com paládio de ouro (100 s, 50 mA), usando um dispositivo de pulverização (Balzers SCD 050, Balzers, Balzers, Liechtenstein). Posteriormente, as imagens foram obtidas com o aumento de $500 \times$ a 10 kV (JSM-6010PLUS /LV SEM, JEOL, Tóquio, Japão) (CARVALHO *et al.*, 2016b).

5.4.8 Análise estatística

Inicialmente, o teste de Kolmogorov-Smirnov foi utilizado para avaliar a normalidade. Na primeira parte do estudo, um Teste “t” pareado foi realizado para comparar os tratamentos do peptídeo de estaterina (solubilizado em água ou em tampão fosfato). Além disso, foi realizada a análise por ANOVA (a dois critérios), com as seguintes variáveis: presença ou ausência da PAE e grupos de tratamentos, seguida pelo teste de Tukey. Posteriormente, foi realizada a análise por ANOVA (um critério), seguida pelo teste de Comparação Múltipla de Tukey (apenas com os tratamentos envolvendo a presença da PAE). Todas as análises estatísticas consideraram o nível de significância de 0,05.

5.5 RESULTADOS

5.5.1 Comparação do peptídeo de estaterina solubilizado em água ou solução tampão

Os resultados foram divididos em duas partes. Na primeira parte, por razões metodológicas, foi comparado o tratamento com o peptídeo de estaterina solubilizado em água

ou em tampão fosfato. Desta forma, o peptídeo solubilizado em água foi capaz de fornecer uma maior proteção para o esmalte quando comparado com o peptídeo de estaterina solubilizado em tampão fosfato, apresentando maior %IRS ($p=0,0158$) e menor liberação de cálcio ($p=0,0019$) (Figura 5). Portanto, o peptídeo de estaterina solubilizado em água foi utilizado para as análises posteriores.

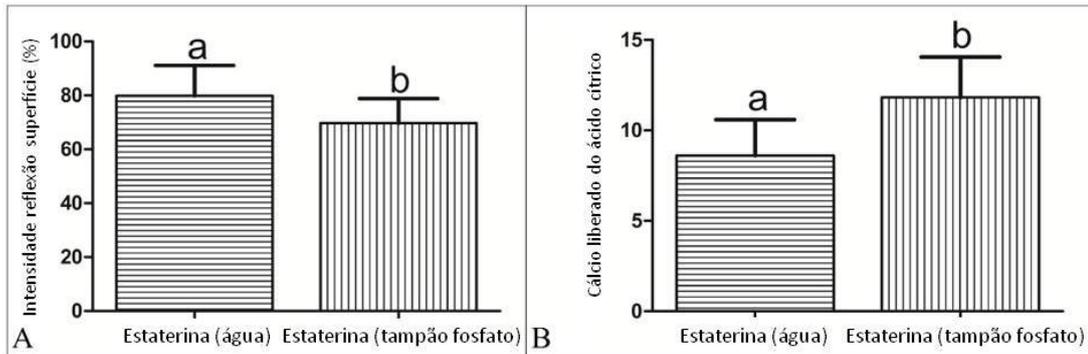


Figura 5. Comparação da solubilização do peptídeo de estaterina em água e tampão fosfato. A) Relação da intensidade de reflexão da superfície (%IRS). B) Cálcio liberado para o ácido cítrico (nmol de $\text{Ca}^{2+}/\text{mm}^2$ de esmalte). Letras distintas indicam diferenças significativas entre os grupos. ($n/\text{grupo}=17$; $p<0,05$).

5.5.2 Mecanismo de ação das proteínas/peptídeos pelo Reflectômetro

Na segunda parte do estudo, foi analisado o efeito das proteínas/peptídeos na superfície do esmalte (SPAЕ) e na presença da PAЕ (CPAЕ), considerando os grupos Controles e os tratamentos (CaneCPI-5, Hemoglobina e o peptídeo de Estaterina). Além disso, foi comparado o efeito do grupo da Combinação com os demais tratamentos (neste caso, apenas os grupos CPAЕ).

Em relação à ANOVA (dois critérios) da %IRS, o grupo controle apresentou a menor proteção (menor %IRS, $p<0,01$). Nele, a presença da PAЕ foi capaz de proteger significativamente o esmalte ($65\% \pm 2,75$) quando comparado a condição SPAЕ ($51\% \pm 2,75$), assim como o grupo da hemoglobina. Entretanto, o grupo da CaneCPI-5 apresentou um efeito oposto, já o grupo do peptídeo de Estaterina não demonstrou diferença significativa entre a condição CPAЕ e SPAЕ. Todos os tratamentos com proteínas e peptídeo protegeram o esmalte contra a erosão, apresentando valores de %IRS maiores do que os grupos controle (SPAЕ e CPAЕ) ($p<0,01$). A atuação dos tratamentos diretamente na superfície do esmalte (SPAЕ), não apresentou diferença significativa entre Hemoglobina (SPAЕ; $75\% \pm 2,75$) e o peptídeo de Estaterina (SPAЕ; $73\% \pm 2,75$). Entretanto, a CaneCPI-5 apresentou significativamente o melhor efeito protetor (SPAЕ; $106\% \pm 2,75$). Por outro lado, a atuação dos tratamentos na

engenharia de película adquirida não apresentou diferença entre os três grupos envolvendo proteínas/peptídeo ($85\% \pm 2,75$, $91\% \pm 2,75$ e $81\% \pm 2,75$, para CaneCPI-5, Hemoglobina e o peptídeo de Estaterina, respectivamente) (Figura 6A). Além disso, a análise ANOVA (um critério), envolveu apenas os grupos CPAE e demonstrou que o grupo da Combinação forneceu o melhor efeito protetor (significativo: $112\% \pm 2,75$) em comparação aos tratamentos isolados (Figura 6B). Observando cada grupo de proteína/peptídeo, a CaneCPI-5 apresentou a melhor proteção ao atuar diretamente na superfície do esmalte, enquanto a Hemoglobina apresentou a melhor proteção ao atuar na engenharia de película adquirida, e o peptídeo de Estaterina não demonstrou diferença significativa no modo de ação (Figura 6A).

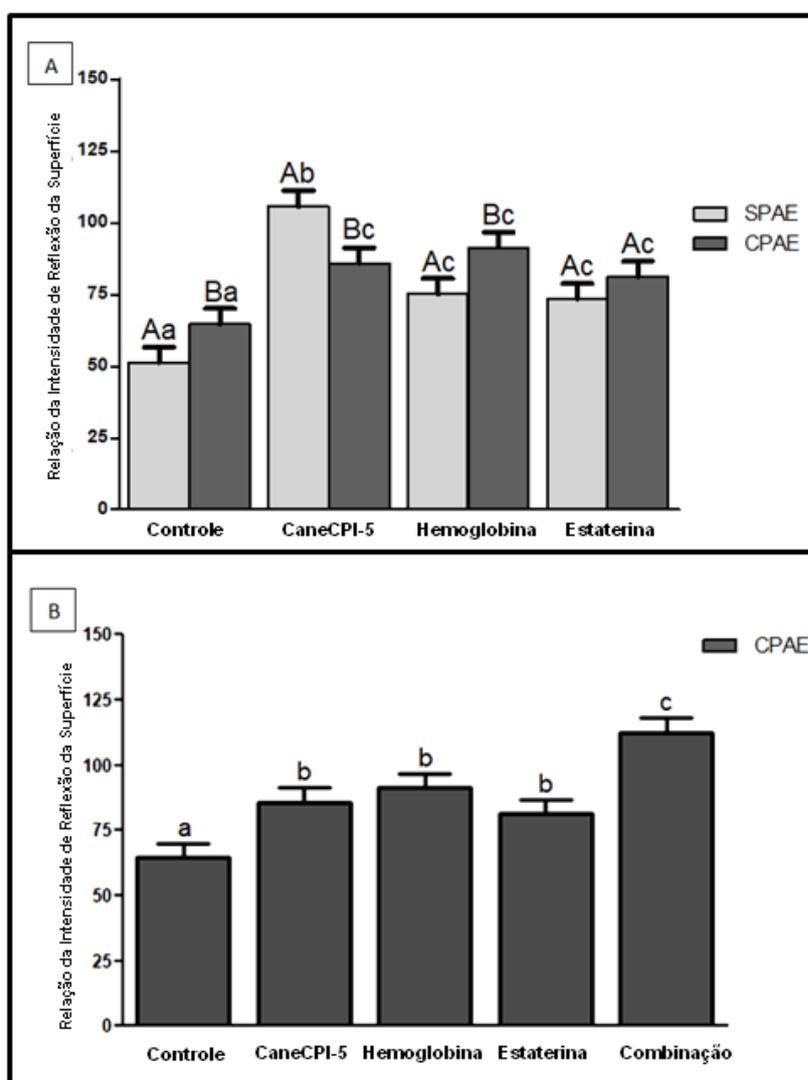


Figura 6. Relação da intensidade de reflexão da superfície (%IRS). A) As colunas cinza-claros representam os grupos sem película adquirida do esmalte (SPAE). As colunas cinza escuro representam os grupos com formação da película adquirida do esmalte (CPAE). Letras distintas maiúsculas denotam diferenças significativas entre a presença e a ausência da PAE. Letras distintas minúsculas denotam diferenças significativas entre os tratamentos. (n/grupo=7; ANOVA dois critérios; $p < 0,05$). B) As colunas cinza escuro representam os grupos com

formação da película adquirida do esmalte (CPAE). Letras distintas minúsculas denotam diferenças significativas entre os tratamentos. (n/grupo=17; ANOVA um critério; $p < 0,05$).

5.5.3 Mecanismo de ação das proteínas/peptídeos pela análise de cálcio

Em relação à análise ANOVA (dois critérios) da AC para o estudo SPAE, o grupo controle apresentou a menor proteção, ou seja, houve a maior liberação de cálcio ($p < 0,01$; $14,2 \pm 0,6$), enquanto a CaneCPI-5 ($8,5 \pm 0,6$), Hemoglobina ($8,9 \pm 0,6$) e o peptídeo de Estaterina ($9,3 \pm 0,6$) apresentaram uma proteção significativa em comparação ao Controle e sem diferença significativa entre os tratamentos com proteínas/peptídeo (Figura 7A). Em todos os grupos não houve diferença significativa entre a condição CPAE e SPAE. Além disso, à análise ANOVA (um critério), envolvendo apenas os grupos CPAE demonstrou que o grupo da Combinação ($7,4 \pm 0,6$) liberou significativamente uma menor quantidade de cálcio no ácido cítrico em comparação ao grupo Controle (Figura 7B). Entretanto, não houve diferença significativa quando o grupo da Combinação foi comparado aos demais tratamentos isolados, tais como, CaneCPI-5 ($10,75 \pm 0,6$), Hemoglobina ($9,4 \pm 0,6$), Estaterina ($8,3 \pm 0,6$) (Figura 7B).

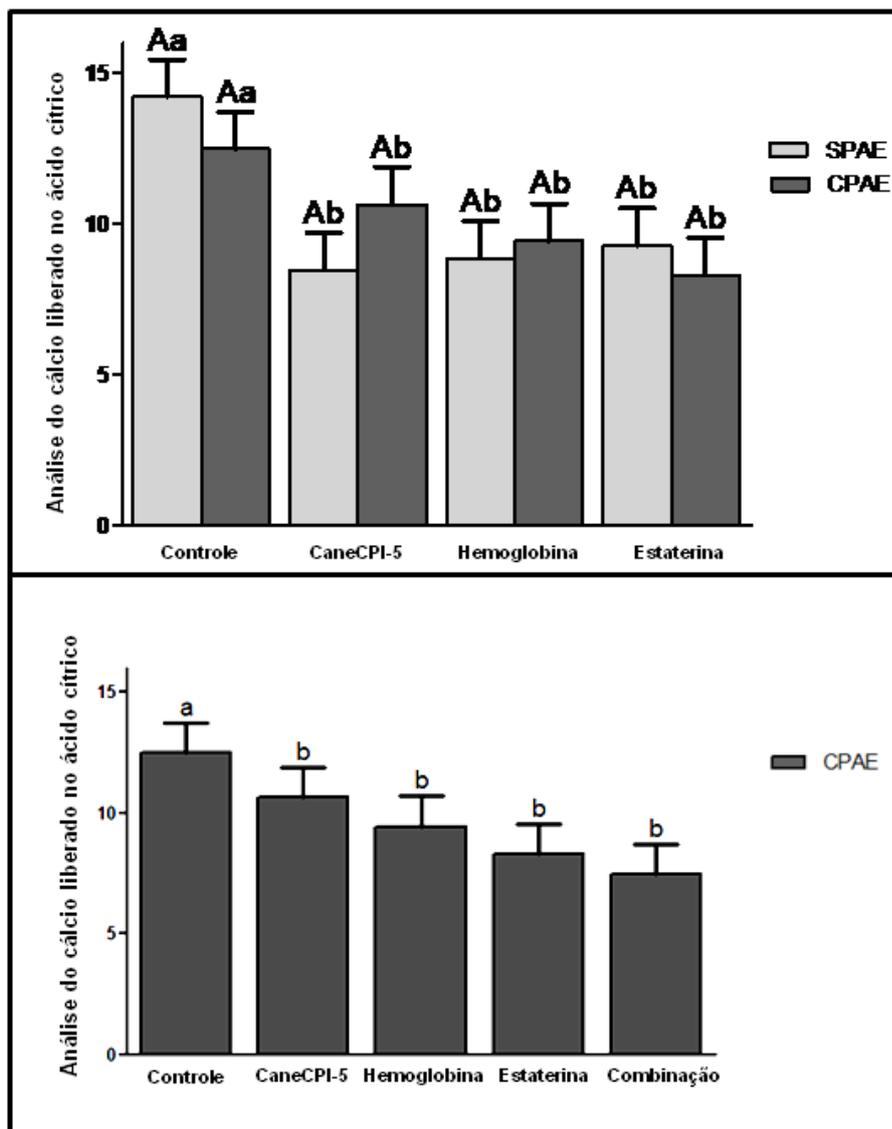


Figura 7. Análise do cálcio liberado no ácido cítrico (nmol de Ca²⁺/mm² de esmalte). A) As colunas cinza-claros representam os grupos sem película adquirida do esmalte (SPAE). As colunas cinza escuro representam os grupos com formação da película adquirida do esmalte (CPAE). Letras distintas maiúsculas denotam diferenças significativas entre a presença e a ausência da PAE. Letras distintas minúsculas denotam diferenças significativas entre os tratamentos. (n/grupo=7; ANOVA dois critérios; p<0,05). B) As colunas cinza escuro representam os grupos com formação da película adquirida do esmalte (CPAE). Letras distintas minúsculas denotam diferenças significativas entre os tratamentos. (n/grupo=17; ANOVA um critério; p<0,05).

5.5.4 Microscopia eletrônica de varredura da superfície do esmalte nativo

As imagens das superfícies do esmalte obtidas pela MEV estão apresentadas na Figura 8. O efeito mais severo do ácido cítrico foi encontrado no grupo Controle. Por outro lado, a menor desmineralização foi mais evidente para o grupo tratado com a combinação das três proteínas/peptídeos, enquanto os demais tratamentos permaneceram semelhantes e sem grandes diferenças nas imagens obtidas (Figura 7).

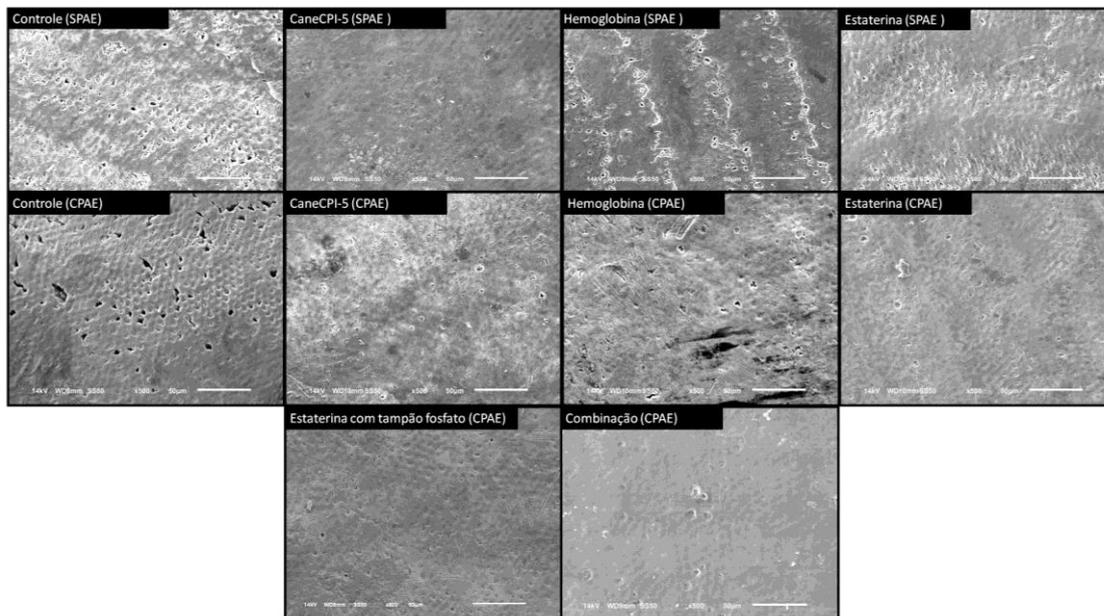


Figura 8. Imagens de microscopia eletrônica de varredura. Obtenção de imagens da superfície do esmalte nativo de acordo com os diferentes grupos de tratamento. (14kV - 500x - 50 μ m). Os espécimes de esmalte dos grupos: Controle (SPAE e CPAE) apresentaram uma maior desmineralização, com a superfície de esmalte mais porosa. Os demais grupos também apresentaram sinais de desmineralização, porém com a superfície de esmalte menos porosa. O grupo Combinação (CPAE) apresentou a menor desmineralização em comparação com os demais grupos (SPAE e CPAE).

5.6 DISCUSSÃO

O termo "engenharia de película adquirida" tem sido sugerido como uma alteração dessa camada orgânica que se forma na superfície do dente por meio da incorporação de proteínas e/ou peptídeos, os quais podem aumentar a proteção contra a desmineralização (VUKOSAVLJEVIC *et al.*, 2014; CARVALHO *et al.*, 2020). No entanto, algumas proteínas e peptídeos podem interagir com a própria superfície do dente, causando impacto na subsequente deposição de proteínas da PAE. Diante de vários tratamentos no presente capítulo, é importante recordar que o capítulo 2 mencionou o fato de primeiramente realizar o protocolo *in vitro*, com o objetivo de selecionar o melhor tratamento antes que os ensaios clínicos sejam realizados (PELÁ *et al.*, 2020b).

Inicialmente, foi comparado o peptídeo de Estaterina preparado em água ou em tampão fosfato. Estaterina é um polipeptídeo composto por duas regiões principais, um N-terminal carregado negativamente e um C-terminal neutro. A primeira região tem sido sugerida como a mais importante para ligação à superfície do dente (RAJ *et al.*, 1992) e conseqüentemente para a proteção dos dentes contra a desmineralização (SHAH *et al.*, 2011). Além disso, Estaterina desempenha outras funções na saliva humana, incluindo a formação da PAE e o tamponamento do fosfato (SANTOS *et al.*, 2008). Estas características desempenham um importante papel na

desmineralização. Com isso em mente, alguns experimentos testaram os peptídeos de Estaterina sintetizados em tampão de fosfato (KOSORIC *et al.*, 2007; SANTOS *et al.*, 2008; TAIRA *et al.*, 2020). Neste estudo, as demais proteínas/peptídeo foram solubilizadas em água e, idealmente, todos estes tratamentos, incluindo o peptídeo de estaterina, deveriam estar na mesma solução base. Isso se torna mais importante quando levamos em consideração o grupo contendo a combinação de todas as três proteínas/peptídeos. Devido a isso, o presente resultado demonstrou que o peptídeo de Estaterina solubilizado em água apresentou melhores resultados de proteção para o esmalte nativo. Portanto, peptídeo de Estaterina solubilizado em água foi usado para a parte principal do estudo.

O aspecto fundamental do presente estudo foi avaliar o efeito das proteínas/peptídeos na atuação direta na superfície do esmalte (SPAE) e na engenharia de película adquirida (CPAE). É bem conhecido que a PAE pode proteger o esmalte contra a desmineralização (PEDERSEN e BELSTRØM, 2019) e isso foi observado no presente estudo. A análise da %IRS mostra que a presença da PAE no grupo Controle demonstrou melhor proteção contra a erosão dentária do que o grupo Controle SPAE. No entanto, a análise da liberação de cálcio no ácido cítrico não foi tão clara. Isso pode estar relacionado à presença de cálcio na PAE (JAGER *et al.*, 2011). Nos grupos SPAE, a liberação de cálcio foi exclusivamente da superfície exposta do esmalte, e pode-se esperar que seja maior, pois não possui proteção da PAE. Entretanto, nos grupos CPAE, parte do cálcio identificado também foi liberado da própria PAE. É importante mencionar que o espécime de esmalte foi totalmente imerso em saliva, e a película foi formada em todos os lados, mesmo na superfície protegida com esmalte de unha. Assim, quando um espécime foi imerso em ácido cítrico, o cálcio foi liberado não apenas do esmalte dentário exposto, mas também da PAE que cobria todos os lados do espécime, possivelmente levando a um aumento da quantidade de cálcio identificados nos grupos CPAE. Nessa perspectiva, os resultados de cálcio devem ser interpretados com essa restrição em mente.

Ao analisar cada tratamento separadamente, observamos que o grupo contendo a CaneCPI-5, demonstrou melhor efeito protetor ao atuar diretamente na superfície do esmalte (SPAE) do que ao atuar na engenharia de película adquirida. Isso pode estar relacionado à sua alta força de ligação à hidroxiapatita, conforme detectado por experimentos de Microscopia de Força Atômica (SANTIAGO *et al.*, 2017). Além disso, foi visto que a cistatina é ácido-resistente, então especulamos que a CaneCPI-5 tenha um mecanismo de ação diretamente na superfície do esmalte, local onde esta proteína permanece (em partes) após o desafio ácido (Figura 9), levando a um efeito protetor. Apesar da proteção um pouco menor, a CaneCPI-5 ainda mostrou um efeito na engenharia de película adquirida, uma vez que levou a melhores

resultados do que o grupo controle. Esses resultados indicam que estudos posteriores avaliando o uso da CaneCPI-5 contra a erosão dentária, devem aplicar essa proteína diretamente no esmalte e não na PAE, por exemplo, após a realização de uma profilaxia profissional.

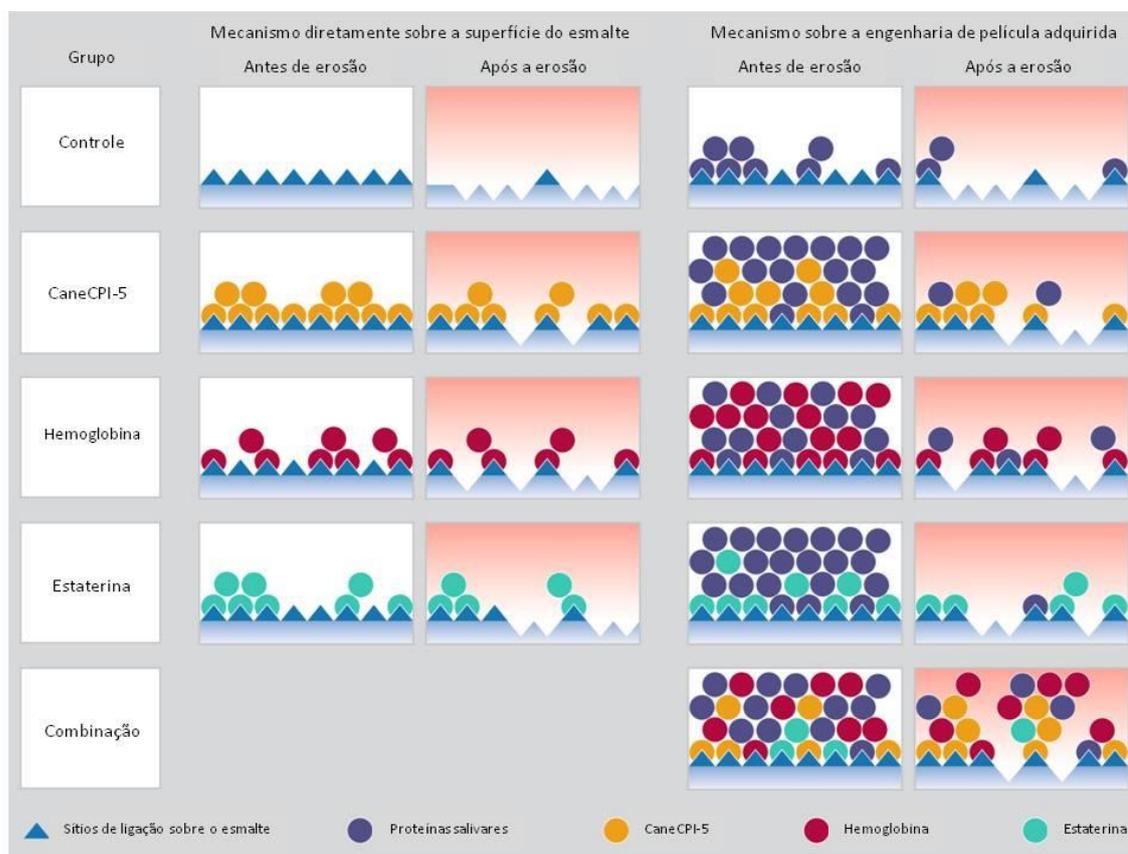


Figura 9. Modelo do mecanismo de ação para cada tratamento. Demonstração das diferentes proteínas/peptídeo atuando diretamente na superfície do esmalte e/ou na engenharia de película adquirida, com seus prováveis efeitos antes e depois da erosão por ácido cítrico. Cada linha demonstra o mecanismo de um grupo diferente, representado pelas diferentes bolas coloridas (diferentes proteínas/peptídeos). O lado esquerdo (duas primeiras colunas) demonstra o mecanismo diretamente na superfície do esmalte (antes e depois da erosão) sem a presença da película. O lado direito (duas últimas colunas) demonstra o mecanismo relacionado à engenharia de película adquirida (antes e depois da erosão).

Com relação à Hemoglobina, essa proteína também é uma candidata com potencial para proteger contra a erosão dentária. A concentração desta proteína é cerca de 3 vezes maior na PAE de pacientes com refluxo gastroesofágico que não apresentam DDE (MARTINI *et al.*, 2019), podendo, portanto, ser um dos fatores de proteção nestes pacientes. Um estudo anterior do nosso grupo mostrou proteção significativa da Hemoglobina quando o esmalte polido foi erodido com ácido clorídrico (MARTINI *et al.*, 2020). Neste momento, essa proteína foi testada em esmalte humano nativo com ácido cítrico, e como esperado, a Hemoglobina também protegeu o esmalte contra a desmineralização, porém apresentou um melhor efeito protetor na engenharia de película adquirida do que quando ela atuou diretamente na superfície do esmalte. Isso foi notável, uma vez que a Hemoglobina tem forte afinidade para se adsorver à

hidroxiapatita. Sua taxa de adsorção aumenta à medida em que a sua concentração aumenta (PEARCE e BIBBY, 1966), e à medida em que o pH diminui (YU *et al.*, 2017). Embora nossa concentração de hemoglobina tenha sido relativamente alta no presente estudo (1 mg/mL) em comparação com os valores da concentração salivar, onde os pacientes saudáveis apresentam apenas 0,29 µg/mL (MAENG *et al.*, 2016), o nosso pH permaneceu neutro. Isso provavelmente dificultou sua adsorção à superfície do esmalte, mas ainda ocorreu a adsorção, pois apresentou efeito protetor em relação ao grupo Controle. O mecanismo exato de como a Hemoglobina adere ao esmalte ainda não está bem descrito, e deve ser investigado em futuros trabalhos. De qualquer forma, os nossos resultados mostram que a Hemoglobina teve melhor mecanismo de ação na engenharia de película adquirida, aumentando o efeito protetor da PAE contra a erosão dentária (Figura 9), corroborando o fato de que a PAE de alguns pacientes com refluxo, contendo maior quantidade de hemoglobina na saliva pode prevenir o DDE (MARTINI *et al.*, 2019).

A Estaterina é conhecida há muito tempo por ser uma das proteínas precursoras que formam a camada basal da PAE, devido à sua alta afinidade pela hidroxiapatita (HANNIG e JOINER, 2006; SIQUEIRA *et al.*, 2012b). Além disso, semelhante à CaneCPI-5, a Estaterina também é uma proteína ácido-resistente, permanecendo na superfície do esmalte após ataques erosivos (TAIRA *et al.*, 2018). Portanto, era esperado que este peptídeo se comportasse de maneira semelhante à CaneCPI-5. Curiosamente, embora a o peptídeo tenha produzido melhores resultados protetores do que o grupo controle, não foi observada diferença entre sua ação diretamente na superfície do esmalte e na engenharia de película adquirida. Isso pode ser porque existe Estaterina na saliva, que já pode aderir à superfície do esmalte e competir para ocupar os sítios de ligação disponíveis no esmalte. Uma vez que esses locais são ocupados, nenhuma proteção adicional é observada com a engenharia de película adquirida envolvendo a solução do peptídeo. No entanto, quando esta solução de peptídeo é usada como tratamento (sem a presença de saliva), o peptídeo pode adsorver nos locais de ligação do esmalte e fornecer um efeito protetor (TAIRA *et al.*, 2020) (Figura 9). Neste caso, sua ligação está relacionada aos 15 resíduos N-terminais, explicado anteriormente. Essa conformação gera densidades de cargas negativas e resíduos de fosfato são posteriormente atraídos por resíduos de cálcio da hidroxiapatita (RAJ *et al.*, 1992; TAIRA *et al.*, 2020).

O melhor efeito protetor observado neste estudo foi o grupo da Combinação, envolvendo as três proteínas/peptídeos. Por meio da análise da %IRS, este grupo proporcionou uma proteção (significativamente melhor por ANOVA um critério) em comparação aos demais grupos. Embora os resultados de liberação de cálcio não tenham sido tão claros, como discutido

acima, ainda houve uma tendência desse grupo em liberar menos cálcio, ou seja, melhor proteção. Com base nos resultados dos outros tratamentos com proteínas/peptídeos isolados, podemos especular o mecanismo de ação dessa combinação (Figura 9). Nossa hipótese é de que a CaneCPI-5 desempenhou um papel mais importante na adsorção ao esmalte, enquanto que a hemoglobina e o peptídeo de Estaterina tiveram um efeito mais notável na engenharia de película adquirida. Além disso, também é provável que essas proteínas/peptídeos tenham um efeito sinérgico, o que levou a melhores resultados da %IRS. De fato, os valores de reflexão final foram superiores a 100%, e as razões para isso podem ser explicadas de duas formas: ou o esmalte não estava desmineralizado ou havia resquício da PAE na superfície do esmalte, mesmo após a imersão no NaOCl (LUSSI *et al.*, 2012). A primeira explicação provavelmente não aconteceu porque os desafios ácidos foram capazes de causar desmineralização em todos os outros grupos cobertos com a PAE (ver outros grupos: CPAE). Além disso, é provável que restos da PAE tenham permanecido no esmalte, mesmo após a incubação dos espécimes em NaOCl (BREVIK *et al.*, 2013). Isso é plausível, pois o efeito sinérgico das proteínas/peptídeos provavelmente levou a uma forte ligação à superfície do esmalte, formando uma camada basal forte o suficiente que não foi completamente removida pelo ácido ou NaOCl (Figura 9). Entretanto, essa hipótese merece ser analisada em futuros estudos. Também experimentos adicionais devem ser realizados combinando pares de proteínas/peptídeos, a fim de melhor compreender o mecanismo de ação desse sinergismo. Para este grupo da Combinação, no entanto, o procedimento SPAE não foi realizado porque a solução é destinada a uma aplicação clínica, na qual a presença de saliva é indelével.

É importante considerar que o tempo de incubação dos espécimes de esmalte é bastante longo (2 h), mas foi realizado seguindo protocolos anteriores para permitir comparações entre os estudos (CHEHAIB e LUSSE, 2011; SANTIAGO *et al.*, 2017; TAIRA *et al.*, 2020; MARTINI *et al.*, 2020). Além disso, a formação da PAE foi feita *in vitro*, o que leva a uma PAE diferente daquela formada *in situ* ou *in vivo*, conforme apresentado no capítulo anterior. Neste capítulo também demonstrou que houve um aumento da estaterina e da hemoglobina na condição *in vitro*, indicando que estes tratamentos podem ser reproduzíveis quando comparados a uma condição clínica (PELÁ *et al.* 2020b). Por outro lado, houve uma diminuição da cistatina na condição *in vitro*, porém é importante lembrar que os tratamentos empregados no presente estudo (cistatina derivada da cana-de-açúcar: CaneCPI-5, peptídeo de Estaterina e hemoglobina comercial) são diferentes das proteínas humanas da PAE. Em adição, nosso protocolo *in vitro* usou saliva e dentes humanos (nativo), enquanto a maioria dos outros estudos envolvendo o tratamento da erosão dentária foram realizados em superfícies de dentes polidos (esmalte ou

dentina) (SCHLUETER *et al.*, 2011). Isso pode ser considerado uma vantagem do presente estudo, pois está mais intimamente relacionado com a situação clínica. Apesar da presente condição *in vitro*, nossos resultados abrem um caminho para os procedimentos preventivos, envolvendo componentes orgânicos, tais como proteínas e peptídeo apresentados acima. Além disso, estes resultados servirão de suporte para o próximo capítulo, o qual propõe desenvolver uma combinação entre componentes orgânicos e inorgânicos para a proteção contra a erosão dentária por meio da engenharia de película adquirida.

5.7 CONCLUSÃO

Com base em nossos resultados, todas as hipóteses nulas foram rejeitadas. Em conclusão, o tratamento com a CaneCPI-5 demonstrou melhor efeito protetor diretamente na superfície do esmalte. Por outro lado, a Hemoglobina apresentou melhor resultado na engenharia de película adquirida, diferentemente do peptídeo derivado da Estaterina, o qual não apresentou diferença entre as duas condições. Em adição, a combinação das três proteínas/peptídeo proporcionou o melhor efeito protetor para o esmalte nativo. O provável mecanismo de ação para esta combinação é por meio da adsorção das proteínas/peptídeo diretamente na superfície do esmalte, bem como por meio da engenharia de película adquirida.



**ENGENHARIA DE PELÍCULA ADQUIRIDA USANDO UMA COMBINAÇÃO DE
COMPONENTES ORGÂNICOS (CISTATINA DA CANA-DE-AÇÚCAR) E
INORGÂNICOS (FLUORETO DE SÓDIO) CONTRA A EROSÃO DENTÁRIA**

6.1 INTRODUÇÃO

O quarto capítulo encontra-se publicado na *Caries Research* no ano de 2022. Este estudo está intitulado “Acquired pellicle engineering using a combination of organic (sugarcane cystatin) and inorganic (sodium fluoride) components against dental erosion”. A autoria está representada na seguinte ordem: Vinícius Taioqui Pelá, Samira Helena Niemeyer, Tommy Baumann, Flávia Mauad Levy, Flávio Henrique Silva, Adrian Lussi, Thiago Saads Carvalho, Marília Afonso Rabelo Buzalaf (Ver a página inicial do artigo em APÊNDICE 4).

É importante iniciar este capítulo destacando que o DDE é amplamente comum devido à sua etiologia multifatorial e ao aumento de sua gravidade com a idade (MARTIGNON *et al.*, 2021). A maioria dos estudos estão usando componentes inorgânicos contra este tipo de desgaste, como por exemplo, o flúor (F^-) (LUSSI *et al.*, 2019; ZANATTA *et al.*, 2020) e íons de estanho (KONRADSSON *et al.*, 2020). O mecanismo de proteção destes componentes (na superfície do esmalte) está associado à reação com a hidroxiapatita, reduzindo a solubilidade do esmalte (WACHTEL, 1964; SCHLUETER *et al.*, 2009a). Assim, o uso de uma solução comercial contendo $SnCl_2/NaF/AmF$ é, até o momento, o tratamento mais eficaz contra a desmineralização erosiva (HUYSMANS *et al.*, 2014). Além disso, essa solução é comumente utilizada como controle positivo em estudos de erosão dentária (DE SOUZA *et al.*, 2018; IONTA *et al.*, 2020).

Apesar dos componentes inorgânicos serem as estratégias mais estudadas para proteger a erosão dentária, o papel dos componentes orgânicos não pode ser desconsiderado. O principal componente orgânico é a PAE, que é um fator intrínseco ao paciente, entretanto existem os componentes extrínsecos, tais como polifenóis ou outras proteínas que também podem interagir com a superfície do dente ou com a própria PAE (BUZALAF *et al.*, 2012a). Nesse sentido, os estudos estão sendo voltados para as estratégias preventivas por meio da “engenharia de película adquirida”, onde componentes orgânicos extrínsecos aderem e modificam a PAE, melhorando suas características naturais de proteção (CHEAIB e LUSSI, 2011; CHEAIB *et al.*, 2015; WEBER *et al.*, 2015; REHAGE *et al.*, 2017; ZIMMERMANN *et al.*, 2019; NIEMEYER *et al.*, 2021). Dentro desse conceito, nosso grupo de pesquisa está focado em proteínas ácido-resistente da PAE, como por exemplo, as cistatinas (DELECRODE *et al.*, 2015a; DELECRODE *et al.*, 2015b). As cistatinas são inibidores de proteases de cisteína, as quais são identificadas em praticamente todos os organismos (BARRETT, 1986). Diante disso, o capítulo anterior demonstrou que a CaneCPI-5 foi caracterizada e empregada para fortalecer a camada da PAE e aumentar seu efeito de proteção contra a erosão dentária (PELÁ *et al.*, 2021a). Além

disso, outro estudo mostrou que esta proteína possui uma alta força de ligação à hidroxiapatita (SANTIAGO *et al.*, 2017), sendo capaz de aderir ao esmalte e modificar a PAE (CARVALHO *et al.*, 2020; PELÁ *et al.*, 2021a).

Devido à sua capacidade de se ligar à hidroxiapatita (SANTIAGO *et al.*, 2017), propõe-se que a primeira aplicação da CaneCPI-5 seja feita em consultório e as subseqüentes aplicações sejam realizadas pelo próprio paciente (auto aplicações). Na condição prática, inicialmente a PAE precisa ser removida por uma profilaxia profissional e, posteriormente realizar a aplicação do tratamento proteico. Esta seqüência de procedimentos tem como finalidade formar uma camada basal da PAE contendo grandes quantidades da CaneCPI-5. Uma vez que foi demonstrado em um estudo *in vivo* que a aplicação desta proteína na superfície do esmalte aumentou a quantidade de proteínas resistentes aos ácidos da PAE, reduzindo a desmineralização erosiva inicial (CARVALHO *et al.*, 2020). Além disso, sugere-se que as aplicações subseqüentes da CaneCPI-5 sejam realizadas pelo próprio paciente em casa (auto aplicações) antes dos desafios ácidos, a fim proteger o esmalte contra a desmineralização.

Até agora, as estratégias envolvendo o uso de compostos orgânicos e inorgânicos para proteger o esmalte contra a erosão dentária foram avaliados apenas separadamente. Diante do contexto, três questões foram levadas em consideração para o presente capítulo: 1) A eficácia do componente orgânico (CaneCPI-5) contra a erosão dentária; 2) O papel favorável do F⁻ no equilíbrio de desmineralização e remineralização (TEN CATE e BUZALAF, 2019); e 3) A sugestão apresentada (no capítulo anterior) sobre o uso de diferentes combinações para potencializar o efeito protetor contra a erosão dentária inicial. Desta forma, torna-se plausível testar a combinação de ambos os componentes (CaneCPI-5 e F⁻) em uma única solução, verificando o seu efeito preventivo contra a erosão dentária, por meio da engenharia de película adquirida.

6.2 OBJETIVO

Assim, este capítulo avaliou a combinação da CaneCPI-5 e fluoreto de sódio (NaF) adicionado a uma solução antes da formação da PAE para a prevenção da erosão dentária. Como este é um primeiro passo envolvendo combinações de componentes, o presente experimento usa uma metodologia *in vitro*.

6.3 HIPÓTESE NULA

A hipótese nula testada foi: a combinação da CaneCPI-5 e NaF adicionado a uma solução antes da formação da PAE não protege o esmalte contra a erosão dentária *in vitro*.

6.4 MATERIAL E MÉTODOS

6.4.1 Questões éticas

Os dentes humanos utilizados neste estudo foram selecionados a partir de um biobanco. A saliva estimulada foi coletada (com consentimento dos participantes) e imediatamente agrupada. Tanto os dentes quanto a saliva foram considerados “irreversivelmente anonimizados”. Dessa forma, não foi obrigatória a aprovação prévia do comitê de ética (Kantonale Ethikkommission: KEK, Switzerland), uma vez que este estudo foi desenvolvido na Universidade de Berna, Suíça.

6.4.2 Preparo dos espécimes

Setenta e cinco espécimes de esmalte humano foram preparados (de terceiros molares), com uma média da área de superfície exposta do esmalte de 17 mm² por espécime. Inicialmente, os dentes foram analisados (visualmente) para quaisquer alterações superficiais e estruturais usando um microscópio (Leica, M420) conectado a uma câmera (Leica, DFC495). Em seguida, os espécimes foram obtidos por um corte entre a coroa e a raiz do dente (ISOMET Low Speed Saw Buehler, Lake Bluff, IL, EUA). Posteriormente, os espécimes foram embutidos em resina acrílica (bloco: 5 cm altura × 5 cm de diâmetro) e polidos com lixa de carboneto de silício de granulação 1.200, 2.500 e 4.000 (papéis ExtecCorp.; Buehler, Lake Bluff, IL, EUA). Para finalizar, foi utilizado um disco de feltro (Buehler, Lake Bluff, IL, EUA) com pasta de diamante de 3 µm (Extec Corp. Buehler, Lake Bluff, IL, EUA). A espessura do esmalte foi padronizada, removendo aproximadamente 150 µm. Os espécimes foram colocados em um banho de ultrassom (7 min a 25 °C) entre cada etapa de polimento e ao final. Depois, os espécimes foram armazenados a 4 °C até o início dos procedimentos experimentais.

6.4.3 Coleta da saliva humana

Foram selecionados nove participantes (quatro mulheres e cinco homens) com idade entre 28 e 35 anos. Os critérios gerais de inclusão foram: não fumantes, não gestantes, sem uso prolongado de medicamentos e sem doenças sistêmicas. Além disso, os participantes precisaram apresentar uma boa saúde bucal. Desta forma foram inclusos apenas pacientes com

fluxo salivar normal (saliva não estimulada > 0,3 mL/min e saliva estimulada > 1,0 mL/min), sem cárie ativa, sem DDE e sem doença periodontal.

A saliva foi obtida no período da manhã (das 9:00 às 9:30 h) por estimulação com *parafilm*, durante 10 min. Toda a saliva coletada foi posteriormente reunida (*pool*). Em seguida, os sobrenadantes foram separados por centrifugação (14.000 g, 20 min, a 4 °C) e armazenados (até o início do experimento) a -80 °C (PELÁ *et al.*, 2021a).

6.4.4 Produção recombinante da CaneCPI-5

A CaneCPI-5 foi produzida em *Escherichia coli* Rosetta (recombinantemente), conforme descrito no capítulo anterior (SOARES-COSTA *et al.*, 2002; SANTIAGO *et al.*, 2017). ; PELÁ *et al.*, 2021a).

6.4.5 Tratamento, incubação da saliva e desafio ácido

Os espécimes (esmalte humano) foram distribuídos aleatoriamente (por números computadorizados) em 5 grupos (n=15/grupo): Água deionizada, pH 7,5 (Controle negativo); Solução comercial composta por SnCl₂/NaF/AmF 800 ppm Sn⁺² de SnCl₂, 125 ppm F⁻ de fluoreto de amina e 375 ppm F⁻ de fluoreto de sódio, pH 4,43, Elmex[®] (GABA International AG, Therwil, BL, Suíça) (Controle positivo; SnCl₂/NaF/AmF); Fluoreto de sódio, 500 ppm, pH 4,41 (NaF); 0,1 mg/mL da CaneCPI-5, pH 7,88 (CaneCPI-5) (SANTIAGO *et al.*, 2017) e uma combinação de 0,1 mg/mL da CaneCPI-5 e 500 ppm de NaF, pH 7,85 (Combinação).

Inicialmente, os espécimes foram tratados (individualmente) de acordo com cada grupo, adicionando 200 µL da respectiva solução de tratamento na superfície do espécime (2 min, a 37 °C, sob agitação de 70 rpm). Posteriormente, a PAE foi formada pela adição de 200 µL de saliva humana estimulada em cada espécime (1 h, a 37 °C, sob agitação de 70 rpm). Em seguida, eles foram submetidos individualmente a um desafio erosivo. Para isso, os espécimes foram imersos em 10 mL de ácido cítrico a 1% (2 min, 25 °C, pH 3,6, sob agitação de 70 rpm) (CARVALHO *et al.*, 2016b) (Figura 10). Imediatamente, os espécimes foram lavados (5 s) e secos (3 s) entre as aplicações (tratamentos, saliva e ácido) e após o último desafio erosivo.

Esses procedimentos (tratamento, formação da PAE e desafio erosivo) foram repetidos 5 vezes, em 5 dias consecutivos. Durante os intervalos, os espécimes foram armazenados em câmara úmida, a 4 °C. Após o último dia, a PAE foi removida pela incubação dos espécimes em 1 mL de solução aquosa de hipoclorito de sódio (NaOCl) a 3% (5 min, a 25 °C) (BREVIK *et al.*, 2013). Em seguida, os espécimes foram enxaguados com água deionizada (5 s) e secos com ar (3 s).

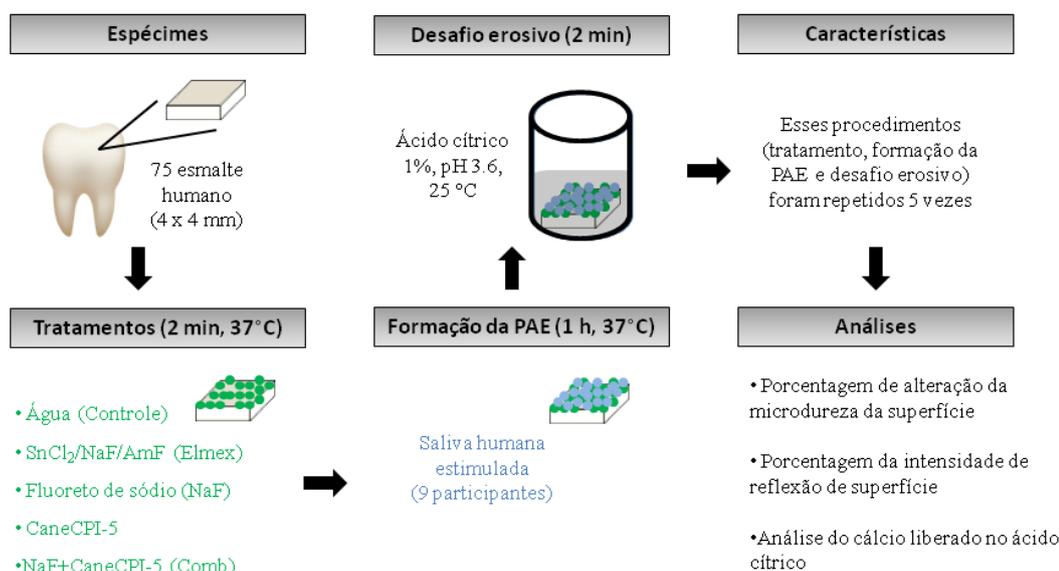


Figura 10. Esquema do protocolo de erosão dentária inicial *in vitro*. Demonstração dos espécimes, grupos de tratamento, formação da PAE, desafio ácido e diferentes métodos para a análise.

6.4.6 Porcentagem de alteração da microdureza da superfície

As medições foram realizadas usando uma ponta de diamante (*Knoop*) sob uma carga de 50 g e um tempo de permanência de 10 s (UHL VMHT Microhardness Tester, UHL Technischer Mikroskopie, ABlar, Alemanha). Seis endentações foram realizadas em uma área de superfície livre e sem defeitos nos espécimes (com intervalos de 25 μm entre cada endentação). A análise foi feita no início do experimento (AMSi), e após o último desafio erosivo e a remoção da PAE (AMSf). Para a análise estatística, a porcentagem de alteração da microdureza superficial (%AMS) foi calculada de acordo com a alteração da microdureza, usando a seguinte equação: %AMS: $([\text{AMSi} - \text{AMSf}] / \text{AMSi}) \times 100$ (SANTIAGO *et al.*, 2017).

6.4.7 Porcentagem da intensidade de reflexão da superfície

A análise foi realizada com Refletômetro de mesa antes do experimento (análise inicial da intensidade de reflexão da superfície; IRSi) e ao final do experimento após o último desafio erosivo (análise final da intensidade de reflexão da superfície; IRSf) (CARVALHO *et al.*, 2016a). Para a análise estatística, a porcentagem da IRS (%IRS) foi calculada, de acordo com a seguinte equação: %IRS: $(\text{IRSf} / \text{IRSi}) \times 100$.

6.4.8 Análise do cálcio liberado no ácido cítrico

O ácido cítrico usado nos 5 desafios erosivos para cada amostra (10 mL por amostra e por ciclo) foi reunido, totalizando 50 mL de ácido por amostra. A concentração total de cálcio foi analisada com um espectrômetro de absorção atômica (AAS; AAnalyst 400, Perkin Elmer Analytical Instruments, Waltham, MA, EUA) (SCHLUETER *et al.*, 2011). Além disso, a área de esmalte em cada espécime foi medida e correlacionada com a quantidade de cálcio liberada no ácido cítrico, conforme descrito no capítulo anterior (PELÁ *et al.*, 2021a).

6.4.9 Análise estatística

Foi utilizado o *software* GraphPad Prism (versão 6.0 para Windows, GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, EUA). Todas as análises foram verificadas quanto à normalidade (teste de Kolmogorov-Smirnov) e homogeneidade (teste de Bartlett). Os dados foram analisados por ANOVA e Teste de Comparação Múltipla de Tukey, considerando o nível de significância de 0,05.

6.5 RESULTADOS

6.5.1 Porcentagem de alteração da microdureza da superfície

Os resultados de %AMS demonstraram que o grupo Controle apresentou a maior alteração, devido à perda de dureza significativamente maior (%AMS: 38,7% \pm 1,9%) em comparação com todos os outros grupos. Além disso, não houve diferença significativa entre SnCl₂/NaF/AmF (20,0% \pm 2,1 %), CaneCPI-5 (18,3% \pm 2,1%) e NaF (19,0% \pm 3,0%). Entretanto, o grupo Combinação apresentou o melhor efeito protetor (significativo) contra a erosão (6,8% \pm 2,8%) ($p < 0,05$) (Figura 11).

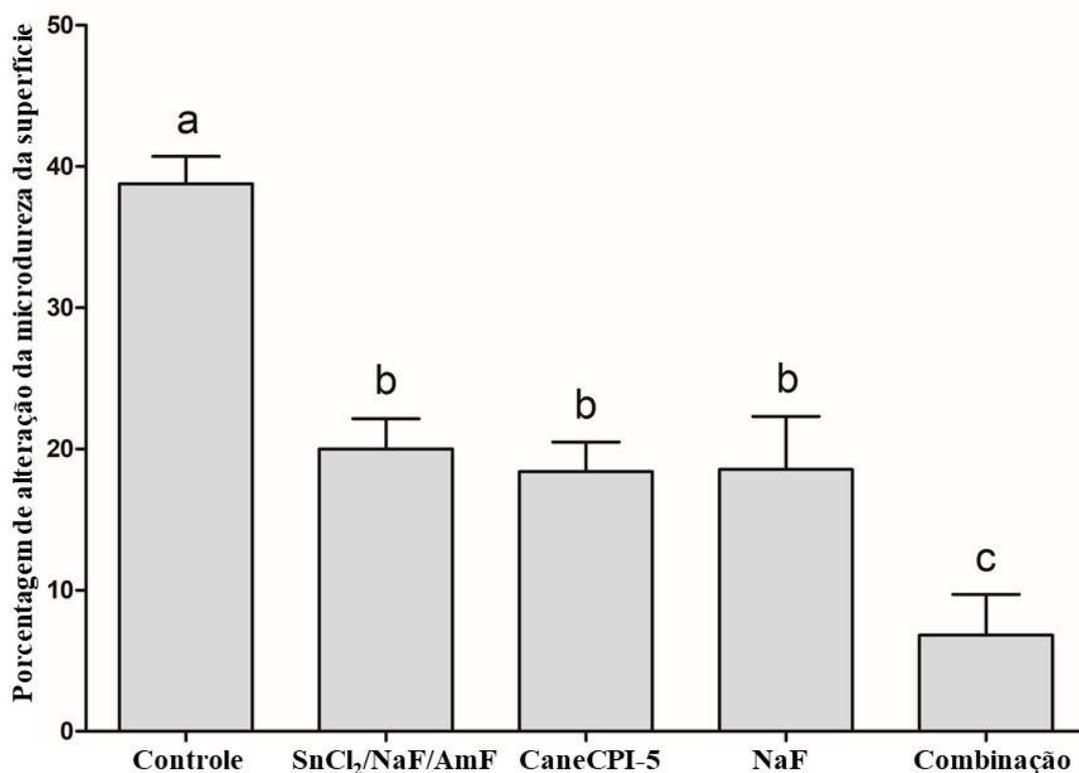


Figura 11. Porcentagem de alteração da microdureza de superfície (%AMS). Diferentes tratamentos: Controle, SnCl₂/NaF/AmF, CaneCPI-5, NaF e Combinação. Barras menores representam menos erosão. Letras diferentes denotam resultados significativos entre os tratamentos ($p < 0,05$).

6.5.2 Porcentagem da intensidade de reflexão da superfície

Com relação à medida da %IRS, o grupo Controle apresentou a menor proteção significativa (menor %IRS: $10,6\% \pm 2,8$) em comparação com todos os outros grupos. O grupo NaF apresentou a segunda menor proteção ($18,0\% \pm 4,9$), sem diferença significativa quando comparado ao grupo da CaneCPI-5 ($20,8\% \pm 4,4$). A melhor proteção (menor alteração na reflexão e apresentando maiores valores de %IRS) foi observada para os grupos SnCl₂/NaF/AmF ($26,1\% \pm 7,5$) e Combinação ($26,3\% \pm 3,5$), sem diferenças significativas entre eles ($p < 0,05$) (Figura 12).

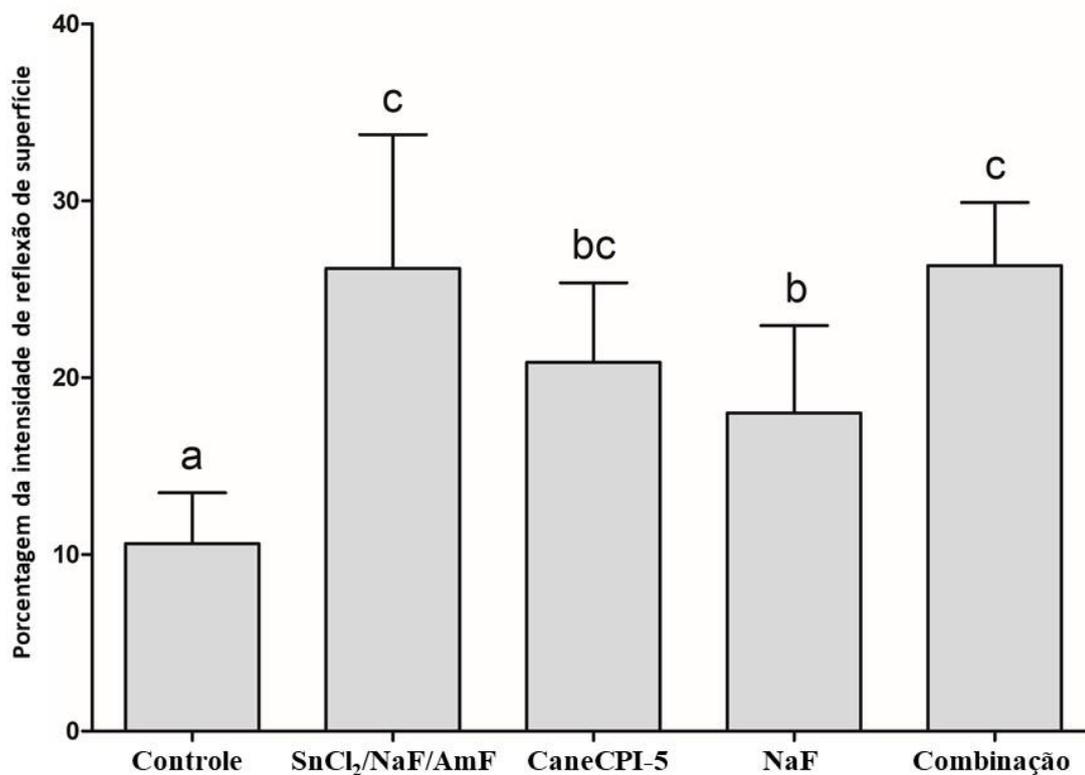


Figura 12. Porcentagem da intensidade de reflexão da superfície (%IRS). Diferentes tratamentos: Controle, SnCl₂/NaF/AmF, CaneCPI-5, NaF e Combinação. Barras maiores significam menos erosão. Letras diferentes denotam resultados significativos entre os tratamentos ($p < 0,05$).

6.5.3 Análise do cálcio liberado no ácido cítrico

A análise de cálcio demonstrou uma menor proteção significativa (maior liberação de cálcio no ácido cítrico) para o grupo Controle ($16,1 \pm 3,3$ nmol Ca²⁺/mm² do esmalte). Todos os outros grupos: SnCl₂/NaF/AmF ($9,6 \pm 1,7$), CaneCPI-5 ($11,0 \pm 3,0$), NaF ($9,5 \pm 1,5$) e Combinação ($8,2 \pm 3,2$) demonstraram uma proteção significativa (menor liberação de cálcio no ácido cítrico) contra erosão dentária quando comparados ao grupo Controle, entretanto não houve diferença significativa entre os tratamentos experimentais ($p < 0,05$) (Figura 13).

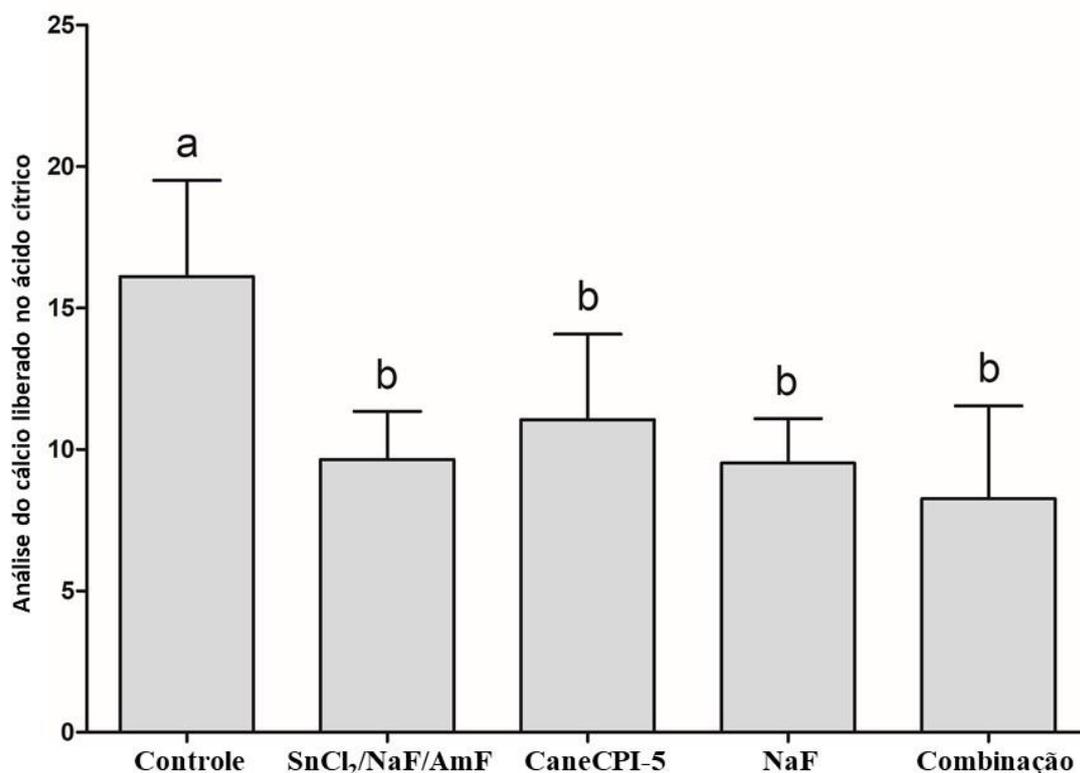


Figura 13. Análise de cálcio presente no ácido cítrico (nmol de $\text{Ca}^{2+}/\text{mm}^2$ do esmalte). Diferentes tratamentos: Controle, $\text{SnCl}_2/\text{NaF}/\text{AmF}$, CaneCPI-5, NaF e Combinação. Barras menores significam menos erosão. Letras diferentes denotam resultados significativos entre os tratamentos ($p < 0,05$).

6.6 DISCUSSÃO

No capítulo anterior e em vários outros estudos, a CaneCPI-5 demonstrou a proteção contra a erosão dentária (SANTIAGO *et al.*, 2017; CARVALHO *et al.*, 2020; PELÁ *et al.*, 2021a;). Entretanto, nos estudos anteriores, o tratamento foi realizado apenas com a CaneCPI-5, enquanto no presente estudo foi analisado como a proteção conferida pela CaneCPI-5 pode ser modificada com a presença de um componente inorgânico (NaF). Nesse contexto, foi sugerida uma solução contendo a combinação da CaneCPI-5 e NaF, a qual foi comparada com as soluções contendo os ingredientes individuais separadamente, bem como a uma solução comercial contendo estanho ($\text{SnCl}_2/\text{NaF}/\text{AmF}$; controle positivo). No capítulo 2, a cistatina identificada na PAE foi subexpressa quando a condição *in vitro* foi comparada com a *in situ* e *in vivo* (PELÁ *et al.*, 2020). Entretanto, o uso CaneCPI-5 pode ter potencializado o efeito ácido-resistente que a cistatina apresenta sobre a superfície do esmalte. Também optamos por um

modelo de erosão dentária inicial, com características mais próximas da condição *in vivo*, ou seja, foram utilizados espécimes de esmalte humano. Em adição, foi formado a PAE (com saliva humana) e, posteriormente, realizado desafio erosivo empregando um ácido inorgânico com composição semelhante ao suco de laranja (CARVALHO *et al.*, 2016b). Além disso, três tipos de análises foram realizados para confirmar a eficácia dos tratamentos, sendo uma delas por meio de uma técnica de reflexão que pode ser utilizada clinicamente, denominada Refletômetro (CARVALHO *et al.*, 2016a). Uma limitação do estudo foi o uso de saliva humana congelada. A saliva congelada pode ter propriedades reológicas diferentes, devido a um teor de proteína menor (cerca de 10%), como foi relatado em um estudo utilizando saliva após 3 dias do congelamento em comparação com a saliva fresca (EMEKLI-ALTURFAN *et al.*, 2013). Entretanto, seria muito difícil obter quantidade suficiente de saliva fresca para o presente estudo. Ainda mais quando levamos em consideração a necessidade de uma composição semelhante de saliva para ser utilizada durante os 5 dias do experimento. Desta forma, o uso de saliva congelada permitiu uma padronização adequada deste fluido a ser utilizado para a formação da PAE.

No presente estudo, foi feito um grupo contendo apenas CaneCPI-5, uma vez que vários estudos testando essa proteína isoladamente consideraram esse componente como um forte candidato para proteger contra a erosão dentária (SANTIAGO *et al.*, 2017; PELÁ *et al.*, 2021a). Nossos resultados corroboram o efeito protetor da CaneCPI-5. Na metodologia, o tratamento foi aplicado antes da formação da PAE. No entanto, é importante destacar que nos dias 2 a 5, a CaneCPI-5 foi aplicada na PAE remanescente. Essa sequência de aplicação (engenharia de película adquirida) apresentou excelentes resultados que podem ser explicados de duas maneiras: 1) a CaneCPI-5 possui alta capacidade de ligação ao esmalte (SANTIAGO *et al.*, 2017). Esta característica permite que a aderência desta proteína à superfície dentária (formando uma camada protetora) dificulte o contato entre o ácido e o esmalte, reduzindo a desmineralização (PELÁ *et al.*, 2021a); e/ou 2) por engenharia de película adquirida, na qual a CaneCPI-5 também interage com a PAE, aumentando a quantidade de proteínas ácido-resistentes para a proteção do esmalte. Este último é o mais provável, porque foi observado em um estudo de prova de conceito *in vivo*, no qual a CaneCPI-5 foi adicionada antes da formação da PAE e, posteriormente, o proteoma desta camada orgânica foi verificada por análise proteômica quantitativa livre de marcadores. Desta forma, a película modificada apresentou uma maior quantidade de proteínas resistentes a ácidos, tais como a cistatina, lisozima e proteína S100-A9. Todas elas desempenham um papel importante contra a desmineralização

do esmalte dentário (CARVALHO *et al.*, 2020). A tradução deste protocolo *in vitro* para a condição clínica compreende os seguintes passos dos procedimentos no consultório odontológico: 1) profilaxia dentária para a remoção da PAE; 2) Primeira aplicação da CaneCPI-5 (em forma de bochecho), permitindo, assim, a ligação desta proteína ao esmalte; e 3) As aplicações subsequentes da CaneCPI-5 em casa para redirecionar a formação da PAE.

O presente resultado do grupo da CaneCPI-5 pela %IRS foi cerca de 20%, já no capítulo anterior o grupo da CaneCPI-5 apresentou uma %IRS de 85% (PELÁ *et al.*, 2021a). Esta diferença está relacionada a alguns aspectos entre o capítulo anterior e o atual: 1) tempo de aplicação do tratamento (2 h *versus* 2 min); 2) tempo de formação da PAE (2 h *versus* 1 h); e 3) diferentes equipamentos (Reflectômetro Optipen *versus* Reflectômetro de mesa).

Com relação aos grupos $\text{SnCl}_2/\text{NaF}/\text{AmF}$ e NaF , ambos os tratamentos apresentaram proteção significativa contra a erosão. Esses grupos contêm F^- , o qual interfere favoravelmente no processo de desmineralização (TEN CATE e BUZALAF, 2019). Além disso, o íon de estanho reage prontamente com a hidroxiapatita, reduzindo a solubilidade do esmalte (WACHTEL, 1964). Em um estudo foi relatado que o pó de hidroxiapatita tratado com NaF , favorece a formação da apatita fluoretada. Além disso, após o tratamento com SnF_2 , sua interação com hidroxiapatita leva à formação de $\text{Sn}_3\text{F}_3\text{PO}_4$ e $\text{Ca}(\text{SnF}_3)_2$, os quais protegem contra a desmineralização (BABCOCK *et al.*, 1978; BAIG *et al.*, 2014). Esta incorporação do estanho torna o esmalte mais resistente aos impactos ácidos e pode proporcionar uma melhor proteção contra a desmineralização. Além disso, o estanho tem efeito sinérgico com o F^- , proporcionando melhor eficácia contra a erosão (SCHLUETER *et al.*, 2009a; SCHLUETER *et al.*, 2009b; DE SOUZA *et al.*, 2018). Nesse sentido, esperava-se que a solução contendo $\text{SnCl}_2/\text{NaF}/\text{AmF}$ (devido à combinação de vários componentes) fornecesse melhores resultados que o grupo NaF .

Curiosamente, não houve diferença significativa entre as soluções $\text{SnCl}_2/\text{NaF}/\text{AmF}$ e NaF para a %AMS e análise de cálcio, entretanto para %IRS o grupo NaF apresentou uma proteção intermediária em comparação aos demais tratamentos experimentais. Existem duas explicações para estes resultados: 1) nosso experimento começou com esmalte sadio e realizamos apenas 5 ciclos. Quando o esmalte sadio é usado, o estanho forma uma camada apenas na superfície, enquanto nos espécimes que sofrem repetidamente ciclos de erosão severos (espécimes desmineralizados com um total de 300 min em ácido), o estanho forma uma camada não apenas na superfície, mas também dentro da camada desmineralizada

(SCHLUETER *et al.*, 2009a), favorecendo o efeito protetor. Portanto, em nosso experimento, é possível que a desmineralização inicial com apenas 5 ciclos tenha sido provavelmente muito leve para que o estanho (da solução SnCl₂/NaF/AmF) superasse o F⁻. A outra explicação 2) pode estar relacionada à engenharia de película adquirida. Tanto o estanho quanto o F⁻ (juntos) podem interagir com a PAE e modificá-la, levando a uma maior abundância de proteínas em comparação ao estanho e o F⁻ utilizados de forma isolados (ALGARNI *et al.*, 2015). Esta ação pode ser atribuída ao nosso grupo controle positivo (SnCl₂/NaF/AmF), que também apresentaria maiores quantidades de proteína, levando a uma alta intensidade de reflexão (LUSSI *et al.*, 2012). Por outro lado, o F⁻ também pode ter interagido com a PAE e conduzido à diminuição de proteínas importantes, tais como a histatina e estaterina (SIQUEIRA *et al.*, 2012b). Isso provavelmente explica a menor intensidade de reflexão no grupo tratado com NaF. Desta forma, o efeito da modificação da PAE nos resultados da %IRS pode estar presente, mesmo após a remoção da película com NaOCl (BREVIK *et al.*, 2013), pois a PAE modificada terá uma maior abundância de proteínas (ALGARNI *et al.*, 2015). Assim, pode ser possível que o NaOCl ainda tenha deixado resquícios da PAE nos espécimes, embora essa suposição ainda deva ser investigada em futuros estudos.

A principal novidade neste estudo foi o grupo combinando o componente orgânico (CaneCPI-5) e inorgânico (NaF), os quais proporcionaram o melhor efeito protetor, conforme observado na análise de %AMS. O mesmo, entretanto, não foi observado na análise de cálcio, embora o grupo da Combinação tenha apresentado uma tendência (porém não significativa) de melhor proteção pela menor liberação de cálcio no ácido cítrico. Ao interpretar os resultados de cálcio, devemos ter em mente que a PAE também libera cálcio para o ácido (JAGER *et al.*, 2011). Então, se os tratamentos estão modificando a PAE e possivelmente alterando o conteúdo proteico dessa camada orgânica, também é possível que a quantidade de cálcio possa estar aumentando. Em outras palavras, o grupo da Combinação obteve maior proteção (como visto na análise de %AMS), provavelmente aumentando o teor de proteína da PAE, e também aumentando a concentração de cálcio, como já discutido no capítulo anterior (PELÁ *et al.*, 2021a). Assim, nossos resultados provavelmente retratam uma possível superestimação do cálcio, não apenas pela desmineralização do esmalte, mas também pela modificação da PAE, principalmente do grupo da Combinação. Da mesma forma, a análise da %IRS demonstrou que os grupos SnCl₂/NaF/AmF e Combinação apresentaram a melhor proteção para o esmalte. Novamente, esses resultados provavelmente podem ser devidos à interferência de componentes remanescentes da PAE, conforme descrito no parágrafo anterior. No entanto, na análise da

%AMS não há influência de proteínas da PAE, garantindo um resultado preciso do efeito protetor do grupo da Combinação. Além disso, o uso prolongado da solução contendo SnCl₂/NaF/AmF pode trazer efeitos adversos à superfície do esmalte, como descoloração e sensação adstringente, ou seja, há uma limitação clínica para o uso frequente dessa solução (DE SOUZA *et al.*, 2018; WEST *et al.*, 2012), enquanto a solução contendo CaneCPI-5 não promove esses efeitos indesejáveis (dados não apresentados) (CARVALHO *et al.*, 2020). Observamos que a combinação da CaneCPI-5 e NaF protegeu o esmalte contra a erosão dentária *in vitro*, sem efeitos colaterais para a superfície dentária. Portanto, nossa hipótese nula foi rejeitada. Em geral, todos os grupos de tratamento protegeram o esmalte humano contra a erosão dentária.

6.7 CONCLUSÃO

Em conclusão, a combinação da CaneCPI-5 (componente orgânico) e o NaF (componente inorgânico) demonstrou um efeito sinérgico, proporcionando uma melhor proteção contra a erosão dentária inicial. Esses resultados ganham força para o desenvolvimento de novos produtos odontológicos relacionados ao controle da erosão dentária por meio da engenharia de película adquirida. Futuros ensaios devem ser realizados para verificar o efeito que esses tratamentos apresentam na PAE em protocolos *in situ*, o qual é caracterizado por desafios erosivos prolongados e/ou combinados com condições abrasivas, com a finalidade de verificar os possíveis efeitos clínicos.

A decorative flourish consisting of a long, thin, brown line that starts with a large, stylized, calligraphic letter 'C' on the left, loops around, and ends with a smaller, similar flourish on the right.

7. **APÍTULO 5**

**SEGURANÇA E EFEITO ANTIEROSIVO *IN SITU* DA CANECPI-5 NO ESMALTE
DENTÁRIO**

7.1 INTRODUÇÃO

O quinto capítulo encontra-se publicado no Journal of Dental Research no ano de 2021. Este estudo está intitulado “Safety and *in situ* antierosive effect of CaneCPI-5 on dental enamel”. A autoria está representada na seguinte ordem: Vinícius Taioqui Pelá, João Guilherme Quintal Lunardelli, Cintia Kazuko Tokuhara, Carlos Condarco Girona, Natara Dias Gomes da Silva, Thamyris de Souza Carvalho, Adelita Carolina Santiago, Beatriz Martines de Souza, Samanta Mascarenhas Moraes, Flávio Henrique Silva, Ana Carolina Magalhães, Rodrigo Cardoso de Oliveira, Marília Afonso Rabelo Buzalaf (Ver a página inicial do artigo em APÊNDICE 5).

Primeiramente, é importante demonstrar que a prevalência estimada do DDE (entre crianças e adolescentes) foi representada em aproximadamente 30% desta população (SALAS *et al.*, 2015). Considerando a natureza progressiva deste desgaste, são necessárias medidas para preveni-la e/ou interceptá-la. A maioria dos estudos sobre produtos odontológicos desenvolvidos inclui componentes inorgânicos (como mencionado no capítulo anterior), especialmente fluoretos (HUYSMANS *et al.*, 2014). Entretanto, poucos estudos estão focados em compostos orgânicos. Diante dessa falta na literatura, nosso grupo voltou a atenção para encontrar proteínas ácido-resistentes na PAE (DELECRODE *et al.*, 2015b). Posteriormente, tendo em vista a relevância econômica e tecnológica para inclusão desse tipo de proteína em produtos odontológicos, foi clonada e expressa (de forma recombinante) a CaneCPI-5 (SANTIAGO *et al.*, 2017).

As cistatinas são inibidores de cisteíno proteases presentes em quase todos os organismos, que foram extensivamente estudadas nas últimas décadas (BARRETT, 1986; SHIBAO *et al.*, 2021). Nas plantas, as cistatinas são classificadas em uma família especial, denominada, fitocistatinas (MARGIS *et al.*, 1998), na qual se inclui a CaneCPI-5. Esta proteína inovadora demonstrou várias características vantajosas para a proteção contra a erosão dentária (SANTIAGO *et al.*, 2017; CARVALHO *et al.*, 2020).

Além disso, o terceiro capítulo da presente tese demonstrou que o efeito protetor da CaneCPI-5 atua diretamente na superfície do esmalte, preenchendo os sítios de ligação disponíveis e atuando como uma barreira protetora contra a erosão dentária (PELÁ *et al.*, 2021a). Para que o conceito de engenharia de película adquirida com CaneCPI-5 possa ser amplamente empregado para prevenir e/ou interceptar clinicamente o DDE, é fundamental avaliar o desempenho desta proteína em estágios mais avançados deste tipo de desgaste, o qual

pode envolver também desafios abrasivos. Ambas as condições estão quase sempre associadas clinicamente e merecerem atenção para interceptá-las.

Além disso, o segundo capítulo demonstrou que o perfil proteômico *in situ* é altamente comparável com a condição *in vivo*, especialmente para a expressão da cistatina (PELÁ *et al.*, 2020a). Portanto, o protocolo que está sendo proposto neste capítulo (*in situ*) se torna altamente relevante e comparável à condição *in vivo*. Entretanto, antes que a CaneCPI-5 seja aplicada em uma condição clínica (para o desenvolvimento de produtos odontológicos), a sua segurança também deve ser avaliada por meio de ensaios citotóxicos envolvendo células da cavidade oral, como por exemplo, fibroblastos gengivais humanos.

7.2 OBJETIVOS

Este capítulo apresenta dois objetivos: 1) analisar a citotoxicidade da CaneCPI-5, em concentrações variando entre 0,025 e 1,0 mg/mL, em cultura de fibroblastos gengivais humanos; e 2) avaliar o potencial protetor da modificação da PAE com uma solução contendo CaneCPI-5 na concentração de 0,1 mg/mL contra a erosão associada ou não à abrasão *in situ*.

7.3 HIPÓTESES NULAS

As hipóteses nulas testadas foram: 1) a CaneCPI-5 em concentrações variando entre 0,025 e 1,0 mg/mL não é citotóxica para os fibroblastos gengivais humanos; e 2) a modificação da PAE com solução contendo a CaneCPI-5 na concentração de 0,1 mg/mL não protege o esmalte contra a erosão associada ou não à abrasão *in situ*.

7.4 MATERIAL E MÉTODOS

7.4.1 Aspectos éticos

Este estudo foi aprovado pelos Comitês de Ética em Pesquisa Humano (86783418.8.0000.5417 e 39327520.2.0000.5417) e Animal (005/2018) da Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo (ver ANEXO 1). Além disso, a

metodologia seguiu as diretrizes da boa prática clínica em conformidade com a Declaração de Helsinque.

7.4.2 Produção recombinante da CaneCPI-5

A CaneCPI-5 foi produzida recombinantemente em *Escherichia coli* Rosetta (DE3), conforme descrito no capítulo 3. (SOARES-COSTA *et al.*, 2002; SANTIAGO *et al.*, 2017; PELÁ *et al.*, 2021a).

7.4.3 Estudo 1: Segurança da CaneCPI-5 em fibroblastos

7.4.3.1 Cultura de células

As células de Fibroblasto Gengival Humano (FGH) foram obtidas a partir de cultura primária (técnica de explante) do tecido gengival saudável de pacientes que frequentaram a Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo. Os fibroblastos foram mantidos congelados no Banco de Células do Laboratório de Bioquímica da FOB/USP. As células foram cultivadas em meio de cultura Eagle, modificado por Dulbecco (DMEM-Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO, EUA), suplementado com antibióticos (penicilina 100 UI/mL e estreptomicina 0,1 mg/mL) e 10% (v/v) de soro fetal bovino (FBS-GIBCO Laboratories, Life Technologies Inc., Nova Iorque, NY, EUA). Depois disso, as células foram mantidas a 37 °C em uma atmosfera contendo 5% de CO₂ com 95% de ar.

7.4.3.2 Ensaio de Citotoxicidade

Para este ensaio, as células foram plaqueadas com uma quantidade equivalente a 5×10^3 por poço, em placas de 96 poços (Corning Inc., Corning, NY, EUA). Após 48 h de adesão celular, os diferentes grupos com as concentrações de 0,025, 0,05, 0,1, 0,5 e 1,0 mg/mL da CaneCPI-5 (sem alteração na cor) foram adicionados ao meio de cultura. Além disso, um grupo sem CaneCPI-5 foi usado como controle. O meio contendo ou não CaneCPI-5 foi mantido por 1 min ou 24 h em contato com as células de FGH.

A citotoxicidade foi avaliada pelo ensaio de viabilidade celular MTT (Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO, EUA). Desta forma, foi adicionado 0,5 mg/mL de MTT em meio de cultura (em cada poço). Após 4 h de incubação, a absorbância foi avaliada (leitor de microplacas

Synergy H1, BioTek, Winooski, VT, EUA), utilizando o software Gen5 2.06 (OLIVEIRA *et al.*, 2016).

Para o ensaio qualitativo, 104 células foram plaqueadas em lamínulas de cultura de tecidos de 13 mm (Sarstedt, Inc; Newton, NY, EUA) em placa de 24 poços (Corning Inc., Corning, NY, EUA). Após 48 h de adesão celular, todos os grupos foram adicionados ao meio de cultura, conforme descrito acima.

7.4.3.3 Microscopia Confocal de Fluorescência

As células foram fixadas em formalina a 10% (Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO, EUA) (seguido de 3 lavagens com PBS) e permeabilizadas com solução de Triton X-100 a 0,5% (Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO, EUA). O citoesqueleto foi corado com Rodamina/Faloidina (Molecular Probe, Eugene, OR, USA) e o núcleo com DAPI 4',6-Diamidino-2-Phenilindole, Dihydrochloride (Invitrogen, Life Technologies Inc., New York, NY, USA) (KIHARA *et al.*, 2004). Em seguida, as lamínulas foram fixadas sobre lâminas contendo meio de montagem e vedadas. Por fim, as células foram analisadas por microscopia de fluorescência confocal (40x, Leica TCS SPE Confocal Laser Scanning Microscope, Mannheim, BW, Alemanha).

7.4.3.4 Coloração de Hematoxilina Eosina (HE)

As células foram fixadas com formalina 10% por 30 min, seguido de 3 lavagens com PBS. Em seguida, foram coradas com Hematoxilina de Harris por 3 min, e lavadas com álcool ácido 0,5% por 30 s. Posteriormente, as células foram coradas com Eosina 1% por 2 s, seguido de lavagens com álcool absoluto 95% (1 min) e Xilol (30 s) (SI *et al.*, 2015). As células foram fixadas em lâminas com Entelan (Merck KGaA, Darmstadt, HE, Alemanha) e cada morfologia celular foi examinada pelo microscópio óptico invertido, 10x (BX43F, Olympus Corporation, Tóquio, Japão) (SI *et al.*, 2015).

7.4.3.5 Análise estatística

Foi utilizado o software GraphPad Prism 6 (GraphPad software Inc., La Jolla, CA, EUA). Após a verificação de normalidade (teste de Kolmogorov-Smirnov) e homogeneidade (teste de Bartlett), os dados foram analisados por ANOVA e teste de Tukey ($p < 0,05$).

7.4.4 Estudo 2: Eficácia da CaneCPI-5 contra a erosão associada ou não à abrasão do esmalte *in situ*

7.4.4.1 Obtenção dos dentes e preparo dos espécimes de esmalte

Foram utilizados 180 espécimes de esmalte bovino recém-extraídos e armazenados a 4 °C em solução de timol a 0,1 % (pH 7,0). Em seguida, os dentes foram selecionados por meio de uma inspeção visual, a fim de garantir que não apresentassem manchas ou trincas, situação na qual os dentes foram excluídos do estudo. Posteriormente, a porção radicular foi removida com o auxílio de um aparelho de corte (ISOMET Low Speed Saw Buehler, Lake Bluff, IL, EUA) e um disco diamantado. O esmalte dentário bovino foi fixado com godiva (Kerr) em uma placa de acrílico (40 x 40 x 5 mm³) e parafusada em um aparelho de corte de precisão com dois discos diamantados e um espaçador de aço inoxidável entre os discos. O corte foi refrigerado com água deionizada na velocidade de 300 rpm. Por fim, foram obtidos os espécimes padronizados de esmalte bovino (4 x 4 mm).

7.4.4.2 Processo de polimento dos espécimes

Após o corte, os espécimes foram submetidos a um processo de polimento. Para tal, eles foram fixados com cera no centro de um disco de acrílico. Posteriormente, foi utilizada uma lixa de carbetto de silício de granulação 320, sob refrigeração com água deionizada para padronizar a espessura de cada espécime, removendo a porção dentinária (obtendo uma espessura total de aproximadamente 2 mm). Em seguida, os espécimes foram reposicionados no disco acrílico e novamente o conjunto foi adaptado à politriz. A superfície do esmalte foi desgastada inicialmente com uma lixa de carbetto de silício de granulação 600, sob refrigeração com água deionizada, durante 2 min. Em seguida, foi feito o polimento com lixa de carbetto de silício de granulação 1.200 (ExtecCorp.), sob refrigeração, durante 3 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 min, 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 preenchido com água deionizada por 7 min a 25 °C (T7 Thornton, com frequência de 40 KHz). Foram removidos aproximadamente 150 µm do esmalte bovino. Ao final do polimento, os espécimes apresentaram planos e com aspecto vítreo. Todas os espécimes foram armazenados em gaze umedecida com água deionizada a 4 °C.

7.4.4.3 Análise inicial por perfilometria de contato

Os perfis da superfície do esmalte foram obtidos com um Perfilômetro de contato (MahrPerthometer, Göttingen, NI, Alemanha), antes de cada fase *in situ*. Para isso, os espécimes foram marcados (com uma pequena cavitação), utilizando uma broca esférica ¼, a fim de possibilitar o exato posicionamento da ponta do Perfilômetro (na primeira varredura de cada espécime) para a perfilometria final. Além disso, para a definição das áreas controle, foi realizada uma marcação com lâmina de bisturi na superfície das amostras, para permitir o exato posicionamento do esmalte cosmético de unha. Posteriormente, foram realizadas cinco varreduras com 4 mm de comprimento e com uma distância de 250 µm entre cada varredura. Após o perfil inicial, 2/3 das superfícies foram protegidas com esmalte de unha vermelho (Risque, São Paulo, SP, Brasil), para obtenção de superfícies de controle. Em seguida, as amostras foram esterilizadas com óxido de etileno [(30% ETO/70% CO₂) por 4 h sob pressão de 0,5 ± 0,1 kgF/cm²] (DE SOUZA *et al.*, 2018).

7.4.4.4 Seleção dos participantes

Foram selecionados 15 adultos com idade variando em 25 a 30 anos (sete mulheres e oito homens). Os critérios de exclusão quanto ao estado geral de saúde foram: gestantes, portadores de doenças sistêmicas, em uso de medicamentos e tabagismo. Os critérios de exclusão para saúde bucal foram: baixo fluxo salivar (considerando o fluxo normal não estimulado < 0,3 mL/min e o fluxo estimulado < 1,0 mL/min), cárie, DDE e doença periodontal.

7.4.4.5 Preparo dos aparelhos palatinos

Os participantes tiveram seus arcos superiores moldados com alginato para a confecção do modelo de gesso pedra. Posteriormente, foi feito o aparelho intrabucal palatino em resina acrílica, no qual foram acopladas aleatoriamente 4 amostras de esmalte bovino, divididas em 2 fileiras verticais correspondentes ao tipo de desgaste, ou seja, 2 amostras para condição de erosão e 2 amostras para condição de erosão mais abrasão. Todas as amostras foram coladas com cera rentes ao aparelho palatino, para evitar acúmulo do biofilme. As amostras foram inseridas no aparelho por meio da aleatorização computadorizada. O aparelho foi envolto em gaze umedecida com água da torneira até o início da fase experimental (DE SOUZA *et al.*, 2018).

7.4.4.6 Grupos experimentais

Os participantes estiveram presentes em 3 fases cruzadas e triplo-cego (participantes, pesquisadores e analistas). Em cada fase, 5 participantes foram atribuídos a uma das 3 soluções de tratamento (determinadas por números aleatoriamente computadorizados), como segue: solução experimental contendo 0,1 mg/mL da CaneCPI-5 preparada em água deionizada (pH final 7,88) (SANTIAGO *et al.*, 2017); solução comercial contendo SnCl₂/NaF/AmF (800 ppm Sn⁺² de SnCl₂, 125 ppm F⁻ de fluoreto de amina e 375 ppm F⁻ de fluoreto de sódio (SnCl₂/AmF/NaF), pH 4,5, Elmex[®] – GABA International AG, Therwil, BL, Suíça - controle positivo); solução placebo (água deionizada, pH 7,4 - controle negativo) (DE SOUZA *et al.*, 2018).

7.4.4.7 Orientações e procedimentos experimentais *in situ*

Para cada fase, um aparelho intraoral palatino foi usado por 5 dias consecutivos entre 8 h e 20 h (ALENCAR *et al.*, 2016). Durante a noite, o aparelho foi armazenado em gaze umedecida com água da torneira. Entre as fases, os participantes tiveram um intervalo de 10 dias sem o uso do aparelho. Durante o período experimental (5 dias), o aparelho intraoral permaneceu na boca, sendo permitida sua retirada apenas para o consumo de água e durante as refeições (com duração máxima de 30 min cada). Os participantes foram orientados a realizar a higiene bucal, utilizando os materiais fornecidos, dentre eles uma escova de dente (Curaprox[®], Kriens, LU, Suíça), fio dental (Jadefrog[®], Londrina, PR, Brasil) e um creme dental com fluoreto (1100 ppm, NaF, Colgate[®], São Bernardo, SP, Brasil). Em adição, não foi permitido o uso de

nenhum produto fluoretado (com exceção do dentifrício e das soluções testadas) (DE SOUZA *et al.*, 2018). Durante as refeições e durante o período da noite, o aparelho foi mantido em gaze umedecida com água da torneira. A higiene oral foi obrigatória 5 min antes de colocar o aparelho na boca. A higienização do aparelho ficou restrita apenas à sua superfície palatina (lado sem as amostras). Todos os participantes foram treinados pelos pesquisadores (antes do início do experimento) a realizar o procedimento correto do protocolo de abrasão, o qual envolveu a escovação individual (para cada amostra) com uma força em torno de 1,5 N.

7.4.4.8 Tratamentos, desafios erosivos e abrasivos

No primeiro dia de cada fase (antes de inserir o aparelho na boca), foi realizado um tratamento adicional (8 h) com uma gota (50 µL) da solução de tratamento em cada amostra por 1 min. Imediatamente, o aparelho foi lavado (com água da torneira) por 5 s e colocado na boca para a formação da PAE. Foram realizados quatro tratamentos antes de cada desafio erosivo (9:59, 13:59, 15:59 e 17:59 h), totalizando 4 tratamentos/dia (Figura 14). Para isso, 1 min antes do desafio ácido, os participantes retiraram o aparelho da boca e realizaram o tratamento (pingando 50 µL em cada amostra por 1 min). Em seguida, eles lavaram o aparelho com água da torneira por 5 s e imediatamente realizaram o desafio ácido extraoral, conforme descrito abaixo.

Os desafios erosivos (Erosão) foram realizados em horários pré-estabelecidos do dia (10:00, 14:00, 16:00 e 18:00 h). Para isso, os participantes imergiram o aparelho em 150 mL de solução de ácido cítrico 0,1% (pH 2,5), em temperatura ambiente, por 90 s (sem agitação). Em seguida, os participantes lavaram os aparelhos com água da torneira por 5 s e os recolocaram na boca. A condição de abrasão foi realizada 30 min após o primeiro (10 h) e o último desafio erosivo (18 h) de cada dia (Erosão+Abrasão). Para isso, os participantes adicionaram uma gota de *slurry* fluoretado (1 g de dentifrício: 3 mL de água deionizada) em cada amostra. Imediatamente, a escovação foi realizada com uma escova de dente elétrica (OralB® Vitality Precision Clean - Electric Toothbrush, Kronberg, HE, Alemanha) durante 15 s (LEVY *et al.*, 2014). Em seguida, os participantes enxaguaram o aparelho com água da torneira por 5 s e o aparelho foi recolocado na boca (Figura 14).

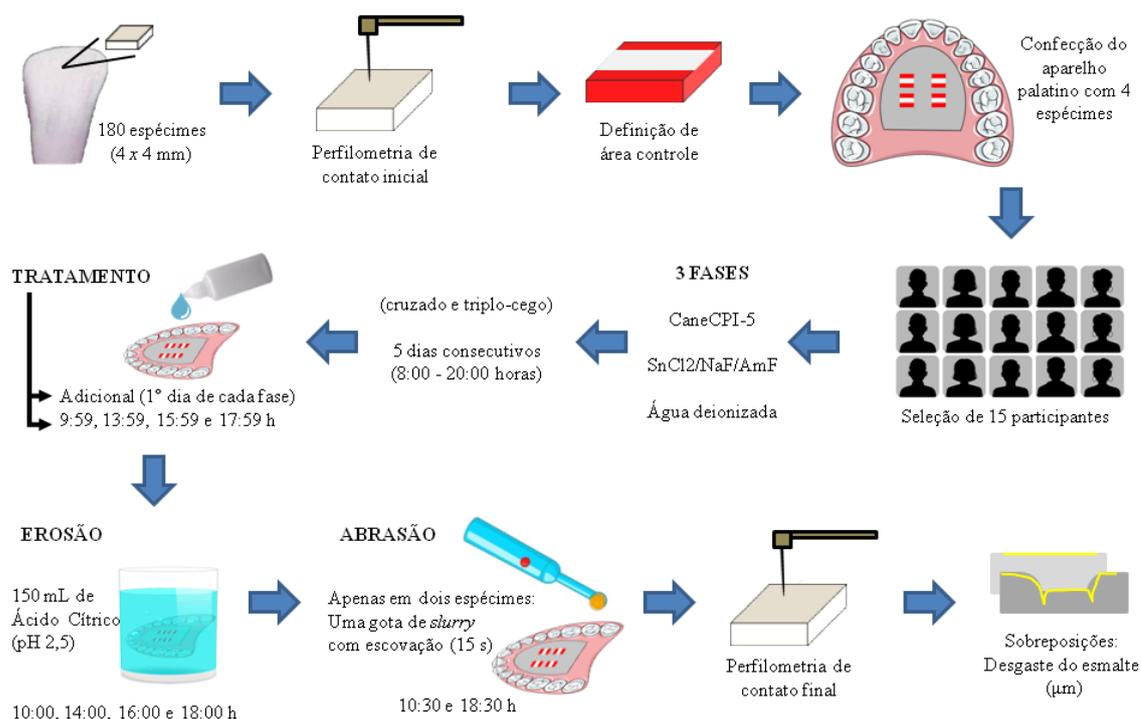


Figura 14. Esquema metodológico *in situ* (tratamento com solução). Demonstração do preparo dos espécimes, análise (inicial e final), bem como os procedimentos realizados pelos participantes durante a fase experimental (tratamento em forma de solução, desafio erosivo e abrasivo).

7.4.4.9 Análise final por perfilometria de contato

Para determinar a alteração do perfil da superfície de cada espécime após a fase *in situ*, foram realizadas cinco leituras finais nas mesmas áreas das leituras iniciais, usando o Perfilômetro de contato. Para isso, o esmalte cosmético de unhas foi removido com solução de acetona (1:1 acetona/água) antes das leituras finais. Para o correto reposicionamento dos espécimes durante as leituras, eles foram inseridos em um dispositivo de metal e a ponta do equipamento foi posicionada sobre a perfuração realizada com broca de 1/4 (feita antes do perfil inicial). Os perfis inicial e final foram comparados, usando o *software* MarhSurf XCR20. A profundidade média da superfície foi analisada para quantificar o desgaste do esmalte (µm) para cada amostra, considerando 0,5 µm como limite mínimo de detecção (LEVY *et al.*, 2014).

7.4.4.10 Análise estatística

Foi utilizado o *software* GraphPad Prism (versão 6.0 para Windows, GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, EUA). Os dados passaram pelos testes de normalidade (Kolmogorov-

Smirnov) e homogeneidade (Bartlett) e foram analisados por ANOVA a 2 critérios de medidas repetidas (tratamento e condição), seguido pelo teste de Sidak, considerando $p < 0,05$.

7.5 RESULTADOS

7.5.1 Efeito da CaneCPI-5 sobre os fibroblastos gengivais humanos

A redução do MTT demonstrou que as concentrações da CaneCPI-5 empregadas no estudo não foram citotóxicas para as células de FGH. Em ambos os tempos experimentais, a viabilidade celular não diminuiu em relação ao grupo Controle. Comparando os grupos tratados, apenas as concentrações de 0,1 e 0,5 mg/mL da CaneCPI-5 apresentaram diferença significativa entre si após 24 h ($p < 0,05$) (Figura 15).

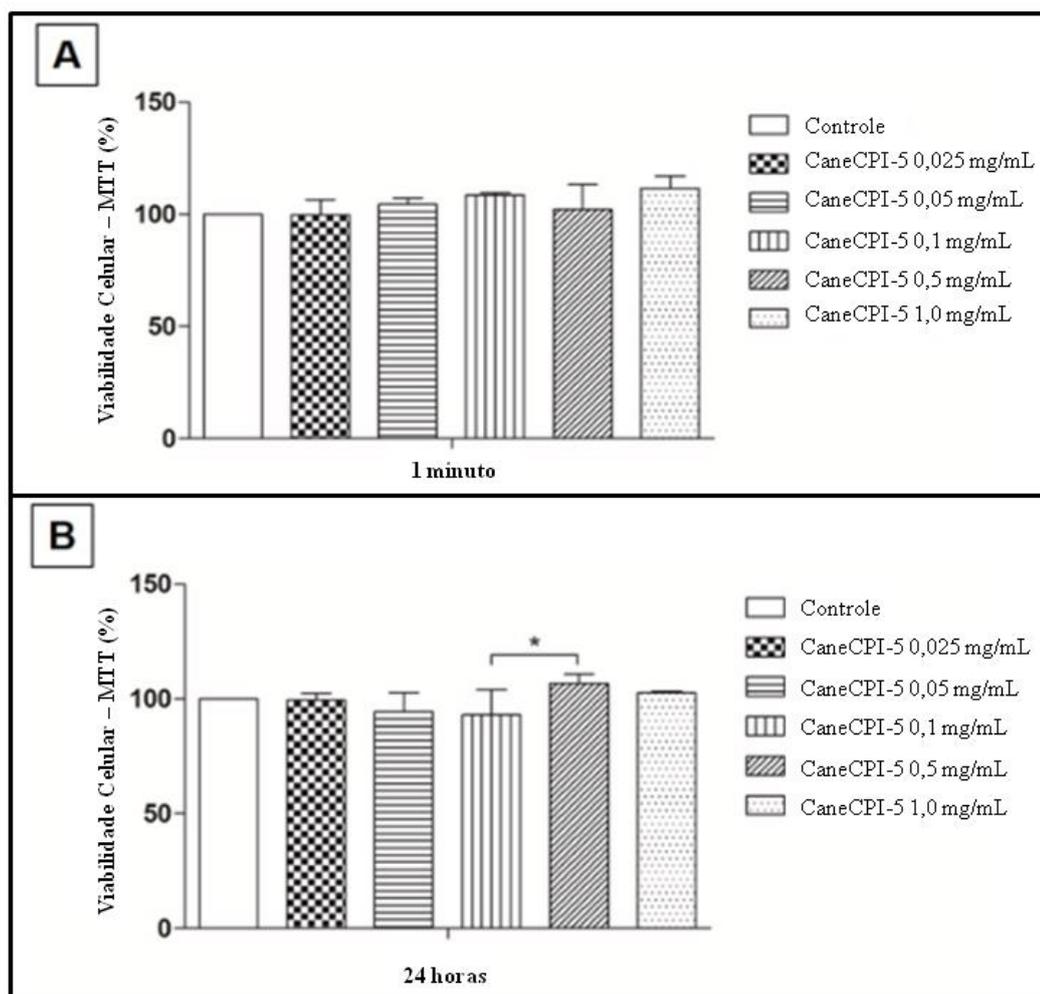


Figura 15. Ensaio colorimétrico por redução de MTT. Viabilidade celular dos Fibroblastos Gengivais Humanos após os tratamentos de 1 min (A) e 24 h (B). Grupos tratados com diferentes concentrações da CaneCPI-5 (0,025, 0,05, 0,1, 0,5 e 1,0 mg/mL) e grupo controle (sem CaneCPI-5). *Representa diferença significativa. Os valores estão representados em porcentagem e o grupo controle foi considerado 100% ($p < 0,05$).

As imagens microscópicas confirmaram os resultados quantitativos do ensaio de viabilidade celular pelo método de MTT. Nenhuma das concentrações da CaneCPI-5 testadas afetou a viabilidade das células de FGH. Em relação as células coradas com HE, observou-se que o tratamento não alterou a morfologia e nem o número de células (Figura 16). Além disso, achados semelhantes foram observados nas imagens de microscopia confocal, ou seja, não foram observadas alterações fenotípicas celulares após o tratamento com CaneCPI-5 (Figura 17).

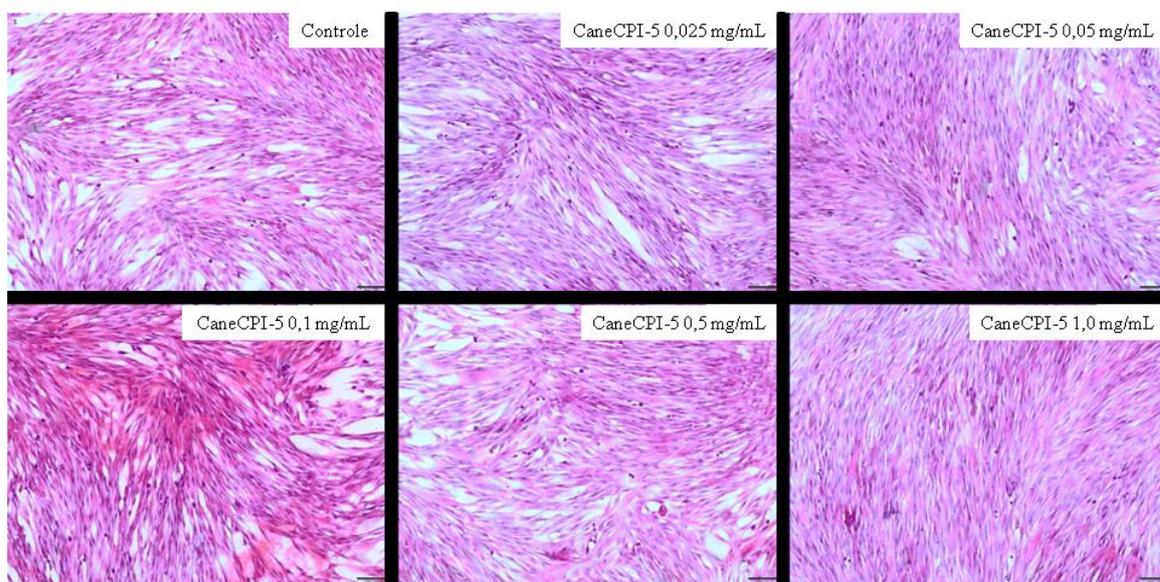


Figura 16. Imagens obtidas de fibroblastos gengivais humanos. Coloração de hematoxilina e eosina após o tratamento de 24 h com diferentes concentrações da CaneCPI-5 (0,025, 0,05, 0,1, 0,5 e 1,0 mg/mL) e sem tratamento com CaneCPI-5 (grupo controle). Escala de 100 μ m. Olympus BX43.

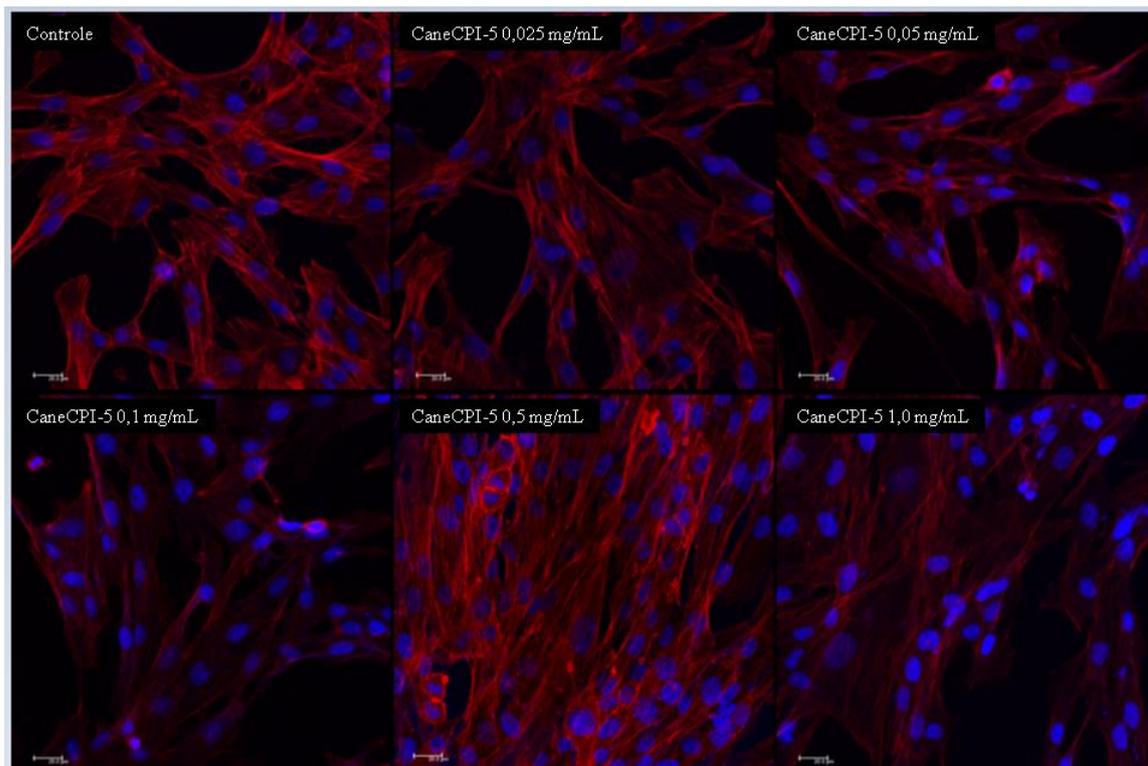


Figura 17. Microscopia Confocal de Varredura a Laser. Organização do citoesqueleto e núcleo de fibroblasto gengival humano após o tratamento de 24 h com diferentes concentrações da CaneCPI-5 (0,025, 0,05, 0,1, 0,5 e 1,0 mg/mL) e sem tratamento da CaneCPI-5 (grupo controle). As células foram marcadas com Rodamina Faloidina (vermelho) e Dapi (azul). Escala de 20 μ m (Leica TCS SPE), usando uma objetiva de 40x/1,15.

7.5.2 Efeito protetor da CaneCPI-5 contra a erosão e abrasão *in situ*

Os resultados mostraram uma diferença significativa entre as duas condições Erosão x Erosão+Abrasão ($F=33,75$, $p<0,0001$) e entre os tratamentos ($F=62,82$, $p<0,0001$), sem interação entre os fatores ($F=0,59$, $p=0,558$). A condição Erosão+Abrasão levou a um desgaste significativamente maior quando comparado com a condição Erosão, independentemente do tratamento ($p<0,05$). Em relação aos tratamentos, o menor desgaste foi encontrado para a solução comercial contendo $\text{SnCl}_2/\text{NaF}/\text{AmF}$ e para a solução contendo CaneCPI-5, as quais não diferiram significativamente entre si, mas ambas apresentaram maior proteção quando comparadas ao controle negativo (água deionizada), independente da condição ($p<0,05$) (Figura 18).

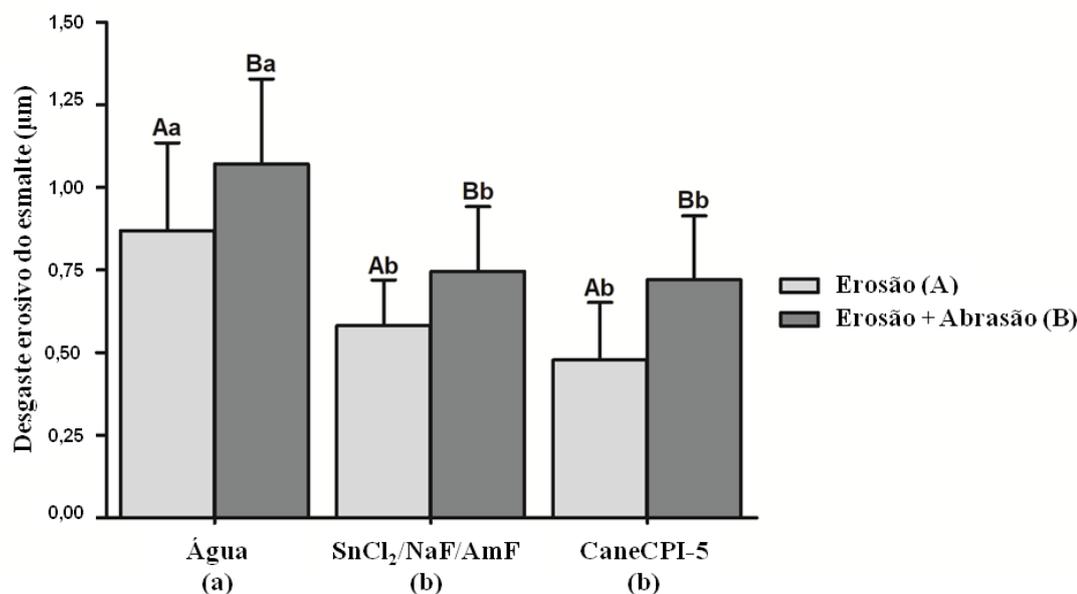


Figura 18. Desgaste erosivo médio do esmalte *in situ* por perfilometria (µm). Tratamento com água deionizada, SnCl₂/NaF/AmF ou CaneCPI-5 0,1 mg/mL. Letras maiúsculas distintas denotam diferenças significativas entre as condições. Letras minúsculas distintas denotam diferenças significativas entre os tratamentos (ANOVA a dois critérios de medidas repetidas e teste de Sidak, $p < 0,05$). As barras indicam desvio-padrão. $n = 15$.

7.6 DISCUSSÃO

O presente estudo reúne resultados importantes que abrem um caminho para o uso clínico da CaneCPI-5 na prevenção do DDE. No entanto, antes que a CaneCPI-5 seja incluída em produtos odontológicos para o uso clínico, são necessários testes de citotoxicidade para garantir sua segurança aos tecidos moles da cavidade oral. Esse aspecto foi avaliado na primeira parte do presente capítulo. O teste por MTT é universalmente aceito pela International Standardization Organization, permitindo a verificação da atividade da succinato desidrogenase presente nas mitocôndrias de células vivas (SILVA *et al.*, 2013). No presente estudo, optamos por FGH obtido por cultura primária do tecido gengival de pacientes saudáveis. Essa escolha é recomendada na literatura, pois simula melhor a condição clínica (GEURTSSEN, 2000). Em relação à escolha dos tempos experimentais, optou-se por um período curto (1 min) para simular o tempo de tratamento frequentemente utilizado durante os tratamentos de bochechos (MARINHO *et al.*, 2016), como o empregado em nosso estudo *in situ* e também aplicado em estudo prévio de erosão inicial *in vivo* (CARVALHO *et al.*, 2020). Além disso, um período mais longo (24 h) foi escolhido para garantir que não fossem encontrados efeitos citotóxicos residuais de longo prazo.

A citotoxicidade celular tem sido utilizada para ensaios de triagem de drogas porque algumas moléculas apresentam efeitos tóxicos na proliferação e viabilidade celular (ADAN *et al.*, 2016). Além da atividade mitocondrial, avaliamos possíveis alterações fenotípicas nas células quando expostas a diferentes concentrações da CaneCPI-5. Esses resultados levaram ao aceite da primeira hipótese nula e garantem a segurança da inclusão da CaneCPI-5 em produtos odontológicos para prevenção do DDE do esmalte, o qual está apresentado na segunda parte do presente capítulo.

Nosso estudo *in situ* constituiu um passo importante para o uso clínico da CaneCPI-5 para proteção contra os desgastes dentários, uma vez que empregamos desafios erosivos prolongados, que também foram associados a episódios abrasivos. Este protocolo experimental simula muito melhor a condição clínica, na qual os desafios erosivos estão associados aos abrasivos, o que chamamos de DDE (Erosive tooth wear - ETW) (LUSSI e CARVALHO, 2014). No terceiro capítulo, a CaneCPI-5 protegeu a superfície nativa do esmalte humano contra a erosão dentária inicial *in vitro*, além disso este estudo demonstrou que o mecanismo de ação desta proteína é por meio do contato direto com o esmalte dentário (PELÁ *et al.*, 2021a). Ademais, outro estudo verificou o efeito protetor da CaneCPI-5 em apenas desafios erosivos leves (3 repetições de 1 min cada, com 0,65% de ácido cítrico e pH 3,5) para que a variável de resposta usada fosse a alteração percentual da dureza da superfície (SANTIAGO *et al.*, 2017). Entretanto, no presente estudo, foi aplicado um modelo de erosão prolongada (DE SOUZA *et al.*, 2018) com quatro desafios (90 s cada) por dia, durante cinco dias, usando ácido cítrico 0,1% (pH 2,5). Mesmo com esse desafio erosivo prolongado, a perda média de esmalte no grupo tratado com CaneCPI-5 ficou abaixo do limite de detecção. Além disso, desafios abrasivos também foram realizados em metade das amostras (duas vezes/dia) (LEVY *et al.*, 2014). Este protocolo experimental provocou uma quantidade de desgaste do esmalte capaz de ser mensurável por perfilometria (WIEGAND e ATTIN, 2011). Em relação ao tipo de amostra, a literatura tem mostrado que dentes bovinos podem ser utilizados para estudos envolvendo desgastes erosivos (LAURANCE-YOUNG *et al.*, 2011) e formação da PAE (PELÁ *et al.*, 2018), sem importantes diferenças quando comparados com dentes humanos.

Um aspecto importante a ser destacado nos procedimentos experimentais é a aplicação da CaneCPI-5 na superfície do esmalte antes da formação da PAE. Este procedimento faz parte do conceito de “engenharia de película adquirida”, que visa redirecionar a formação deste integumento, aumentando a quantidade de proteínas ácido-resistentes, para melhorar o seu potencial protetor contra a desmineralização do esmalte (CARVALHO *et al.*, 2020). Além

disso, a CaneCPI-5 apresenta alta força de ligação à hidroxiapatita (SANTIAGO *et al.*, 2017). Isso permite sua interação direta com a superfície do dente, levando à formação de uma camada basal da PAE contendo grandes quantidades da CaneCPI-5 (PELÁ *et al.*, 2021a; ARAÚJO *et al.*, 2022). Além disso, o tratamento antes de cada desafio erosivo pode melhorar a qualidade da PAE já formada, protegendo contra o ataque ácido imediato, o que pode ser uma estratégia adequada para pacientes de alto risco de DDE. No presente estudo, os tratamentos foram realizados antes de cada desafio erosivo. Seguindo esse raciocínio e aplicando para uma situação clínica, um exemplo clássico seria voltado para os pacientes que teriam que realizar um bochecho com o produto (contendo a CaneCPI-5) antes de consumir bebidas ácidas, tais como refrigerantes e vinhos. É possível que o tratamento também funcione sob aplicações menos frequente, mas isso precisa ser avaliado em estudos posteriores.

O achado mais relevante do presente estudo foi o fato de que a CaneCPI-5 protegeu o esmalte contra a erosão e a erosão associada à abrasão de forma semelhante ao controle positivo (solução comercial contendo $\text{SnCl}_2/\text{NaF}/\text{AmF}$). É importante destacar que a solução comercial avaliada é até agora uma das abordagens preventivas mais eficientes para o DDE, devido à combinação de íons de estanho e fluoreto (HUYSMANS *et al.*, 2014). Nossos resultados são consistentes com os resultados do capítulo anterior, o qual demonstrou que este produto comercial também foi capaz de proteger o esmalte nativo contra a erosão dentária inicial *in vitro* (PELÁ *et al.*, 2022). Além disso, um estudo *in situ* mostrou a redução do DDE para a combinação de íons de estanho e fluoreto (Elmex[®] - erosion protection) (DE SOUZA *et al.*, 2018). No entanto, os produtos que contêm estanho podem provocar sensação amarga e adstringente, além de descoloração na superfície do dente (WEST *et al.*, 2012; DE SOUZA *et al.*, 2018), o que limita seu uso clínico a longo prazo. Por outro lado, a solução experimental da CaneCPI-5 foi bem tolerada pelos participantes, sem queixas sobre o sabor durante o enxágue, além de não causar coloração sobre os dentes (CARVALHO *et al.*, 2020). Diante disso, esses resultados nos levaram a rejeitar a segunda hipótese nula do presente estudo, mostrando que, pela primeira vez, a CaneCPI-5 também é eficaz para os desafios erosivos prolongados e associados ou não a desafios abrasivos.

O próximo passo será realizar estudos clínicos sobre este tema. Apesar de algumas tecnologias terem sido desenvolvidas recentemente para a medição clínica do DDE, elas ainda não são acessíveis (RAKHMATULLINA *et al.*, 2013; MULLAN *et al.*, 2017). Portanto, a maioria das evidências sobre medidas preventivas para estes desgastes ainda vem de estudos *in situ*, os quais são considerados como o modelo que mais se aproxima da condição clínica. Além

disso, o segundo capítulo desta tese demonstrou a comparação do perfil proteômico das películas formadas *in vitro*, *in situ* e *in vivo*. A PAE formada *in situ* demonstrou um aumento da expressão da cistatina e, de maneira geral, foi semelhante à PAE *in vivo* (PELÁ *et al.*, 2020). Considerando que nossa estratégia preventiva é baseada na engenharia de PAE, os resultados obtidos *in situ* com esta proteína podem ser altamente comparáveis com as condições *in vivo*.

7.7 CONCLUSÃO

Nossos resultados demonstraram que a CaneCPI-5 é segura e não promove alterações fenotípicas ao FGH. Além disso, a CaneCPI-5 protegeu o esmalte contra erosão e erosão+abrasão *in situ*. Esses resultados abrem um novo caminho para o desenvolvimento de produtos de higiene bucal voltados à proteção contra o DDE, com base na engenharia de película adquirida. Além disso, é importante avaliar se o mesmo efeito protetor da CaneCPI-5 ocorre com outro veículo de aplicação, como por exemplo, géis, bem como implementar novas técnicas analíticas com a finalidade de se avaliar o DDE clinicamente.

A decorative flourish consisting of a thin, dark line that forms a large, elegant loop on the left side, extends horizontally across the middle, and then forms another large loop on the right side. The number '8.' and the text 'CAPÍTULO 6' are positioned within the left loop.

8. CAPÍTULO 6

**EFEITO PREVENTIVO DO GEL DE QUITOSANA CONTENDO CANECPI-5
CONTRA O DESGASTE EROSIVO DO ESMALTE *IN SITU***

8.1 INTRODUÇÃO

O sexto capítulo encontra-se publicado na *Clinical Oral Investigations* no ano de 2022. Este estudo está intitulado “Preventive effect of chitosan gel containing CaneCPI-5 against enamel erosive wear *in situ*”. A autoria está representada na seguinte ordem: Vinícius Taioqui Pelá, Leonardo Brito, Even Akemi Taira, Flávio Henrique Silva, Joana Claudio Pieretti, Amedea Barozzi Seabra, Cristiane de Almeida Baldini Cardoso, Eduardo Pereira de Souza, Sonia Groisman, Marcela Charantola Rodrigues, Adrian Lussi, Thiago Saads Carvalho, Marília Afonso Rabelo Buzalaf (Ver a página inicial do artigo em APÊNDICE 6).

Como já demonstrado ao longo da tese, a erosão dentária é um grande problema devido ao contato de ácidos sobre a superfície do dente (BUZALAF *et al.*, 2018). Já a abrasão dentária também promove a perda da substância dentária (SCHLUETER *et al.*, 2020), entretanto ela está associada frequentemente à higiene bucal incorreta, precedida ou não por erosão dentária (VORONETS e LUSSI, 2010). Em ambas as condições, a perda de mineral do dente é inicialmente superficial, mas pode ser progressiva (LUSSI *et al.*, 2011), levando ao DDE (de forma mais severa). A prevalência deste tipo de desgaste (em dentes permanentes) está relacionada ao estilo de vida, dieta, características sociodemográficas e econômicas do indivíduo (VIEIRA-PEDROSA e MENEZES, 2020).

Diante desse fato, é crescente a busca por componentes que possam atuar contra esses tipos de desgaste. Atualmente, nosso grupo tem focado em componentes orgânicos, por meio do desenvolvimento de uma solução de enxágue contendo a CaneCPI-5 (SANTIAGO *et al.*, 2017; CARVALHO *et al.*, 2020). Os capítulos 3 e 4 demonstraram que essa proteína recombinante protegeu o esmalte contra desafios erosivos *in vitro* (PELÁ *et al.*, 2021a; PELÁ *et al.*, 2022). Posteriormente, o capítulo 5 demonstrou a proteção da CaneCPI-5 em condições de desgaste mais avançado e mais próximo da situação clínica (PELÁ *et al.*, 2021b). Em todos estes estudos, o principal veículo de aplicação foi baseado em forma de enxaguatório ou gota, ambos apresentando uma solução contendo 0,1 mg/mL da CaneCPI-5, cujo principal modo de ação foi por meio da “engenharia de película adquirida” (SANTIAGO *et al.*, 2017; CARVALHO *et al.*, 2020; PELÁ *et al.*, 2021a; PELÁ *et al.*, 2021b; PELÁ *et al.*, 2022).

Apesar do uso da CaneCPI-5 parecer bem estabelecido em soluções de enxágue, sua aplicação em outros veículos ainda deve ser investigada. Atualmente, géis e cremes dentais estão sendo amplamente estudados contra a erosão e abrasão dentária (CREETH *et al.*, 2020; ZANATTA *et al.*, 2020). Entretanto, vários dentifrícios podem apresentar componentes com

potencial abrasivo, como sílica hidratada, carbonato de cálcio e alumina (LIPPERT, 2013). Por outro lado, a maioria das formulações de gel consiste em componentes não abrasivos, como hidroxietilcelulose e propilenoglicol (KATO *et al.*, 2010).

Em adição, uma nova formulação de gel composta de quitosana e Sn^{+2} abriu um novo caminho de investigação (GANSS *et al.*, 2012; SCHLUETER *et al.*, 2014) com potencial de prevenção contra desgaste erosivo (LEE *et al.*, 2012). Com esses achados promissores, nosso grupo de pesquisa demonstrou recentemente que a incorporação da CaneCPI-5 em um gel de quitosana foi capaz de reduzir a erosão do esmalte e da dentina em um modelo de erosão prolongada *in vitro* (SANTOS *et al.*, 2021), devido à adsorção do gel de quitosana aos cristais de hidroxiapatita e sua interação com as proteínas da PAE (LEE *et al.*, 2012; BEKALE *et al.*, 2015), além do mecanismo de proteção que a própria CaneCPI-5 apresenta sobre o esmalte (PELÁ *et al.*, 2021a).

No entanto, a capacidade preventiva do gel de quitosana contendo CaneCPI-5 nunca foi avaliada em condições mais relevantes do ponto de vista clínico, ou seja, em um protocolo envolvendo desafios erosivos associados ou não aos desafios abrasivos *in situ*.

8.2 OBJETIVO

O objetivo deste capítulo foi avaliar o efeito preventivo de um gel de quitosana contendo CaneCPI-5 contra a erosão e a erosão+abrasão do esmalte *in situ*, por meio do procedimento de engenharia de película adquirida.

8.3 HIPÓTESE NULA

A hipótese nula testada foi que o gel de quitosana contendo CaneCPI-5 não previne a erosão ou erosão+abrasão do esmalte *in situ*, por meio do procedimento de engenharia de película adquirida.

8.4 MATERIAL E MÉTODOS

8.4.1 Questões éticas e seleção dos participantes

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CAAE: 86783418.8.0000.5417) da Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São

Paulo, SP, Brasil. Todos os participantes iniciaram o estudo após assinarem o termo de consentimento livre e esclarecido, seguindo as diretrizes da Declaração de Helsinque. O uso de dentes bovinos para esta pesquisa também foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo (Protocolo: 005/2018) (ver ANEXO 1).

Foram selecionados 16 participantes (oito mulheres e oito homens) com idade entre 27 e 32 anos, por meio dos seguintes critérios gerais de inclusão: mulheres não grávidas, não fumantes, sem uso constante de medicamentos e livres de doenças sistêmicas. Além disso, foram adotados os seguintes critérios de inclusão em saúde bucal: sem a presença de cárie ativa, DDE, doença periodontal, sem o uso de aparelhos ortodônticos e sem aplicação profissional de fluoreto próximo do início do estudo. Ademais, os participantes deveriam apresentar o fluxo salivar normal, considerando para saliva não estimulada o fluxo $> 0,3$ mL/min e para saliva estimulada o fluxo $> 1,0$ mL/min (PELÁ *et al.*, 2021b).

8.4.2 Corte e polimento dos espécimes de esmalte bovino

Os dentes permanentes bovinos foram armazenados em solução de timol a 0,1% (pH 7,0) a 4 °C. Cento e vinte e oito dentes bovinos foram utilizados para o estudo. Desta quantia, duzentos e cinquenta e seis espécimes de esmalte bovino foram cortados (4 mm \times 4 mm \times 3 mm), usando uma máquina de corte com dois discos diamantados (ISOMET Low Speed Saw Buehler, Lake Bluff, IL, EUA). Em seguida, os espécimes foram submetidos ao polimento, removendo aproximadamente 140 μ m da superfície do esmalte bovino. Para isso, foram utilizadas lixas de carboneto de silício de granulação 350, 600 e 1200 (Extec Corp. Papers; Buehler, Lake Bluff, IL, EUA). Para finalizar o polimento, foi utilizado um feltro umedecido com solução de diamante de 1 μ m (Extec Corp. Polishing cloth; Buehler, Lake Bluff, IL, USA). Em seguida, os espécimes foram submetidos à análise visual. Também, os espécimes foram analisados por microscopia para investigação de possíveis manchas e trincas, sendo, neste caso, excluídos do estudo. Posteriormente, os espécimes foram limpos com um ultrassom (T7 Thornton, Unique Ind. E Com. Ltda., São Paulo, SP, BR) contendo água deionizada por 7 min a 25 °C. Finalmente, todos os espécimes padronizados foram armazenados em gaze e algodão umedecidos (com água deionizada) em câmara fria a 4 °C até o início da fase experimental (DE SOUZA *et al.*, 2018).

8.4.3 Preparo do aparelho palatino

Cada participante teve sua arcada superior moldada com gesso, o qual foi utilizado para fazer quatro aparelhos intrabucais palatinos de resina acrílica, ou seja, um aparelho para cada fase *in situ*. Desta forma, cada aparelho apresentou quatro espécimes de esmalte bovino, os quais foram fixados com cera de modelagem (Asfer Indústria Química Ltda., São Caetano do Sul, SP, BR) no mesmo nível da superfície da resina acrílica.

Após análise inicial pelo Perfilômetro e Reflectômetro (descrito na subseção abaixo), a seleção e distribuição dos espécimes no aparelho ocorreram por meio de randomização prévia com o Reflectômetro Optipen, o qual atribuiu dois espécimes para o procedimento de erosão (lado direito) e dois espécimes para o procedimento erosão+abrasão (lado esquerdo). Os aparelhos foram mantidos úmidos com gaze umedecida (com água da torneira) e armazenados a 4 °C até o início da fase experimental (DE SOUZA *et al.*, 2018).

8.4.4 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 os tratamentos foram incorporados durante a dissolução da quitosana. Neste caso, a mistura também foi homogeneizada por 2 h 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.

A produção recombinante da CaneCPI-5 ocorreu por meio da *Escherichia coli* Rosetta, conforme descrito no capítulo 3 (SOARES-COSTA *et al.*, 2002; SANTIAGO *et al.*, 2017; PELÁ *et al.*, 2021a).

8.4.5 Orientações aos participantes

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 e Gamble Company, Cincinnati, OH, EUA) e creme dental com fluoreto (1100 ppmF, NaF; Oral B[®], The Procter e Gamble Company, Cincinnati, OH, EUA) durante todo o estudo; 2) Retirar o aparelho apenas para beber água (no máximo 1 min), durante as refeições (no máximo 20 min) e no período da noite (no máximo 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 após cada refeição e ao acordar; 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) Tomar café da manhã antes da higienização da cavidade oral; 8) Não fazer refeições extras durante o dia e 9) Realizar o procedimento de abrasão com força padronizada (em torno de 1,5 N), conforme previamente treinado pelos pesquisadores (PELÁ *et al.*, 2021b).

8.4.6 Protocolo experimental *in situ*

Os participantes foram alocados dentro de 4 fases cruzadas e triplo-cego (participantes, pesquisadores e analistas). 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 da 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 (PELÁ *et al.*, 2021b).

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 de gel 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 PAE por duas horas (Figura 19).

Todos os espécimes de esmalte foram submetidos a quatro desafios erosivos extraorais (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 *et al.*, 2021b) (Figura 19).

Para a condição ERO, os espécimes de esmalte 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 min 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 escova de dente elétrica (OralB® Vitality Precision Clean - Electric Toothbrush, Kronberg, HE, DE) e *slurry* (1 g de creme dental 1100 ppm F, 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 *et al.*, 2021b) (Figura 19).

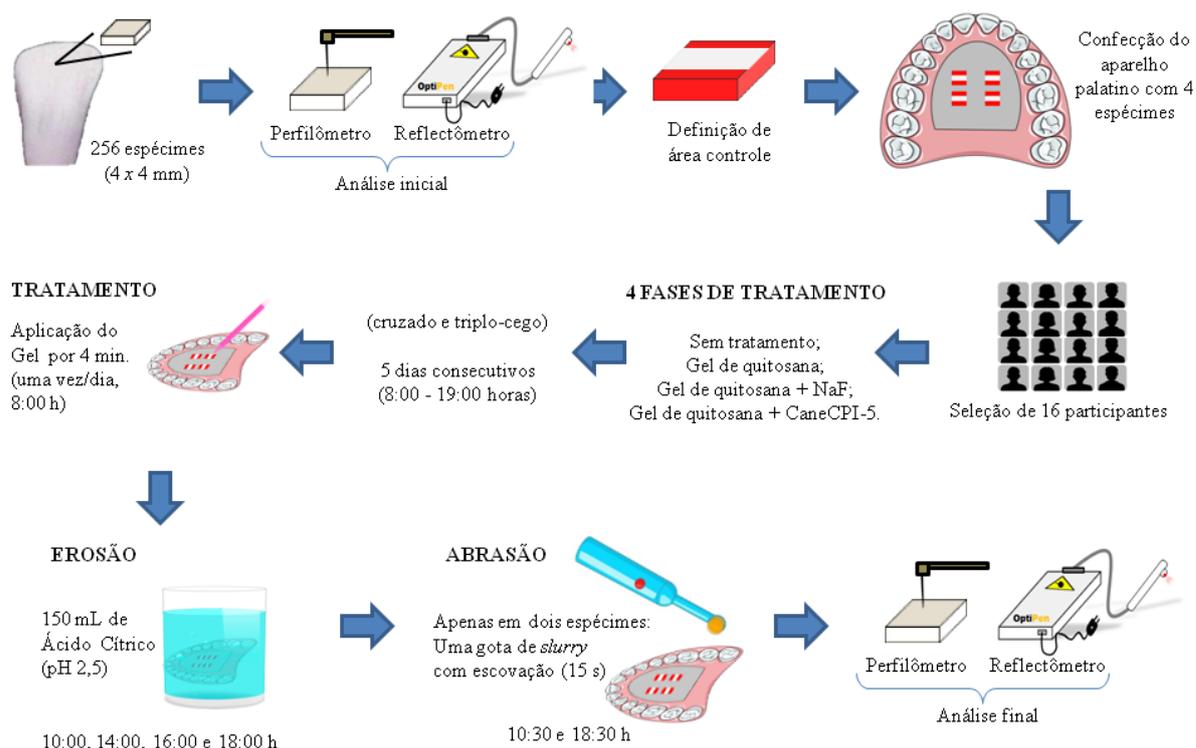


Figura 19. Esquema metodológico *in situ* (tratamento com gel). Demonstração do preparo dos espécimes, análise inicial e final (pelo Perfilômetro e Reflectômetro), bem como os procedimentos realizados pelos participantes durante a fase experimental (tratamento com gel, formação da PAE, erosão e abrasão).

8.4.7 Medição do desgaste do esmalte por perfilometria

Antes do preparo do aparelho palatino, foram realizados os perfis iniciais dos espécimes de esmalte, usando um Perfilômetro de contato (MarSurfe XCR20, 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 e a marcação para posteriormente sobrepor os gráficos. A primeira técnica (furo) serviu como indicador de padronização para a primeira leitura do perfil inicial e final.

Com relação aos parâmetros, foram realizadas cinco leituras em cada espécime (3 mm de comprimento e 250 μ m de distância entre elas). Após a análise inicial, a superfície do esmalte foi dividida em dois terços para obtenção das áreas de controle. As porções externas (extremidades) foram cobertas com esmalte cosmético de unhas (Risque[®], São Paulo, SP, BR), enquanto que a porção central da superfície do esmalte bovino 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).

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, que serviu de suporte para fixação dos espécimes no equipamento; 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 ¼ na superfície dos espécimes para o posicionamento da agulha do Perfilômetro. Posteriormente, os gráficos de cada leitura (perfil inicial e final) foram sobrepostos e comparados por meio do *software* MarhSurf XCR20 (Mahr, Göttingen, NI, DE). Assim, foi medido o desgaste do esmalte (µm), considerando o limite mínimo de detecção de 0,5 µm (PELÁ *et al.*, 2021b)

8.4.8 Medição do desgaste do esmalte pelo Reflectômetro Optipen

A intensidade de reflexão da superfície (IRS) foi realizada pelo Reflectômetro portátil Optipen. A leitura inicial (IRSi) foi feita antes do recobrimento do esmalte de unha sobre a superfície do espécime e antes da perfilometria. Já a análise final (IRSf) foi realizada após a perfilometria final. Para ambas as análises (inicial e final), todos os espécimes foram inicialmente secos por 3 s e a ponta do refletômetro foi tocada na superfície do esmalte bovino. Em seguida, o equipamento portátil foi inclinado em vários ângulos para obter o maior registro de reflexão de cada espécime, conforme descrito no capítulo 3. Os valores apresentados pelo software foram tabulados e calculados da seguinte forma: %IRS: $(\text{IRSf} / \text{IRSi}) \times 100$ (CARVALHO *et al.*, 2016a; PELÁ *et al.*, 2021a).

8.4.9 Análise estatística

Os resultados obtidos dos equipamentos (Perfilômetro e Reflectômetro) 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 a dois critérios (tratamentos e

condições) de medidas repetidas para ambos os fatores, seguida pelo teste de Sidak. Em adição, o coeficiente de correlação de Spearman foi calculado entre o Perfilometria de contato (μm) e o Reflectometria (%IRS). O nível de significância foi estabelecido em 0,05.

8.5 RESULTADOS

8.5.1 Medição do desgaste do esmalte por perfilometria

Com relação à análise de perfilometria (Figura 20), houve diferença significativa entre os tratamentos ($F=206,9$; $p<0,0001$) e entre as condições (ERO e ERO+ABR; $F=106,1$; $p<0,0001$), sem interação significativa entre eles ($F=2,295$; $p=0,0808$). Para os tratamentos, todos apresentaram diferenças significativas, com menor perda de esmalte para o grupo da Gq+Cane, seguido da Gq+NaF e do Gq. O maior desgaste foi encontrado para o grupo St ($p<0,05$). A condição ERO+ABR promoveu um desgaste significativamente maior quando comparada à condição ERO, independente do tratamento ($p<0,05$).

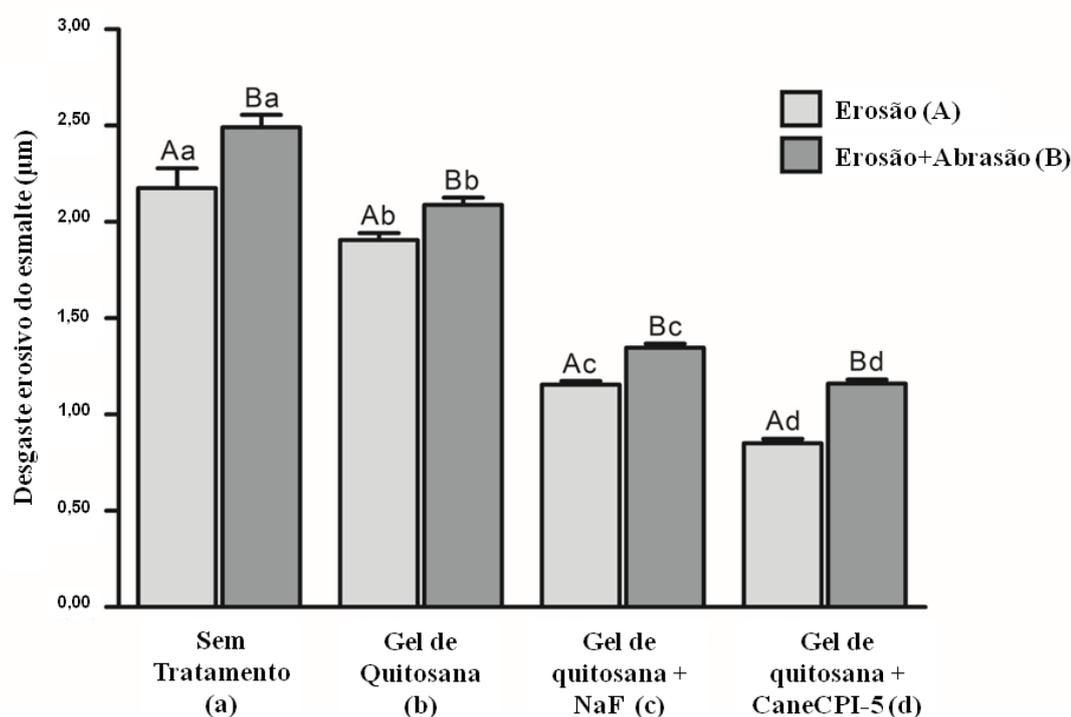


Figura 20. Desgaste erosivo médio do esmalte *in situ* por perfilometria (μm). Grupo não tratado ou tratados por 4 min com diferentes géis de quitosana, submetidos a desafios erosivos (4 vezes/dia) com ácido cítrico 0,1% pH 2,5 por 90 s (Erosão) combinado ou não a desafio abrasivo por meio da escovação elétrica (15 s, 1,5 N; Erosão+Abrasão). Cada fase *in situ* foi realizada por 5 dias. Letras maiúsculas denotam diferenças significativas entre as condições. Letras minúsculas denotam diferenças significativas entre os tratamentos, $p<0,05$. $n=16$. As barras indicam desvio-padrão.

8.5.2 Medição do desgaste do esmalte pelo Reflectômetro Optipen

Em relação à análise da %IRS (Figura 21), houve diferença significativa entre os tratamentos ($F=44,48$; $p<0,0001$) e entre as condições ($F=12,99$; $p=0,0032$), sem interação significativa entre eles ($F=0,829$; $p=0,486$). Com relação à diferença entre os tratamentos, a maior %IRS foi encontrada para os grupos Gq+Cane e Gq+NaF, ambos apresentando proteção significativa quando comparados aos grupos Gq e St para a condição ERO+ABR. Entretanto, na condição ERO, o grupo Gq+NaF não diferiu significativamente do St. A menor %IRS foi encontrada para os grupos St e Gq, os quais não apresentaram diferença significativa entre eles. Com relação às condições, no geral não houve diferenças, exceto para o grupo St, o qual apresentou %IRS significativamente menor para a condição ERO+ABR em relação à condição ERO.

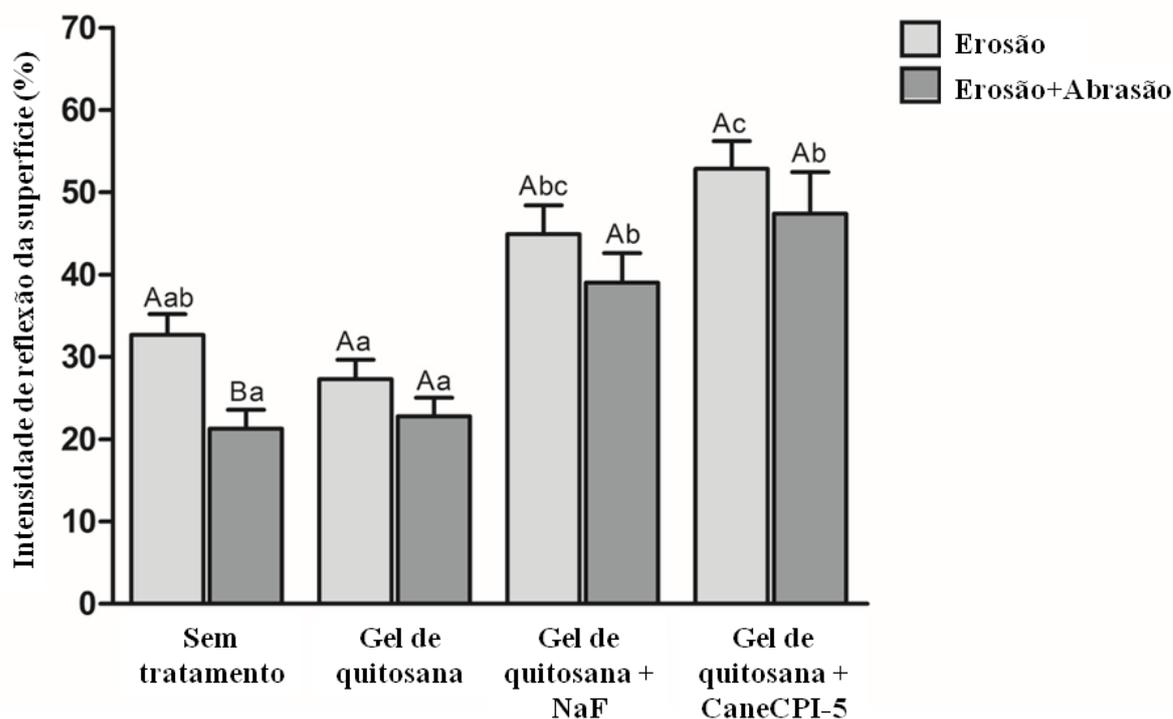


Figura 21. Porcentagem da intensidade de reflexão média da superfície do esmalte bovino, avaliada pelo Reflectômetro Optipen. Espécimes de esmalte bovino não tratado ou tratados *in situ* por 4 min com diferentes géis de quitosana, submetidos a desafios erosivos (4 vezes/dia) com ácido cítrico 0,1% pH 2,5 por 90 s (Erosão) combinado ou não a desafio abrasivo por meio da escovação elétrica (15 s, 1,5 N; Erosão+Abrassão). Cada fase foi realizada por 5 dias. Letras maiúsculas denotam diferenças significativas entre as condições. Letras minúsculas denotam diferenças significativas entre os tratamentos. $p<0,05$. $n=16$. As barras indicam desvio-padrão.

8.5.3 Correlação entre a perfilometria e a reflectometria

Houve uma correlação significativa ($r=-0,5168$; $p<0,0001$) entre a perfilometria (μm) pelo Perfilômetro de contato e a reflectometria (%IRS) pelo Reflectômetro Optipen para a condição ERO ($y=-0,0149x + 2,1231$) e para a condição ERO+ABR ($y=-0,0163x + 2,2887$) (Figura 22).

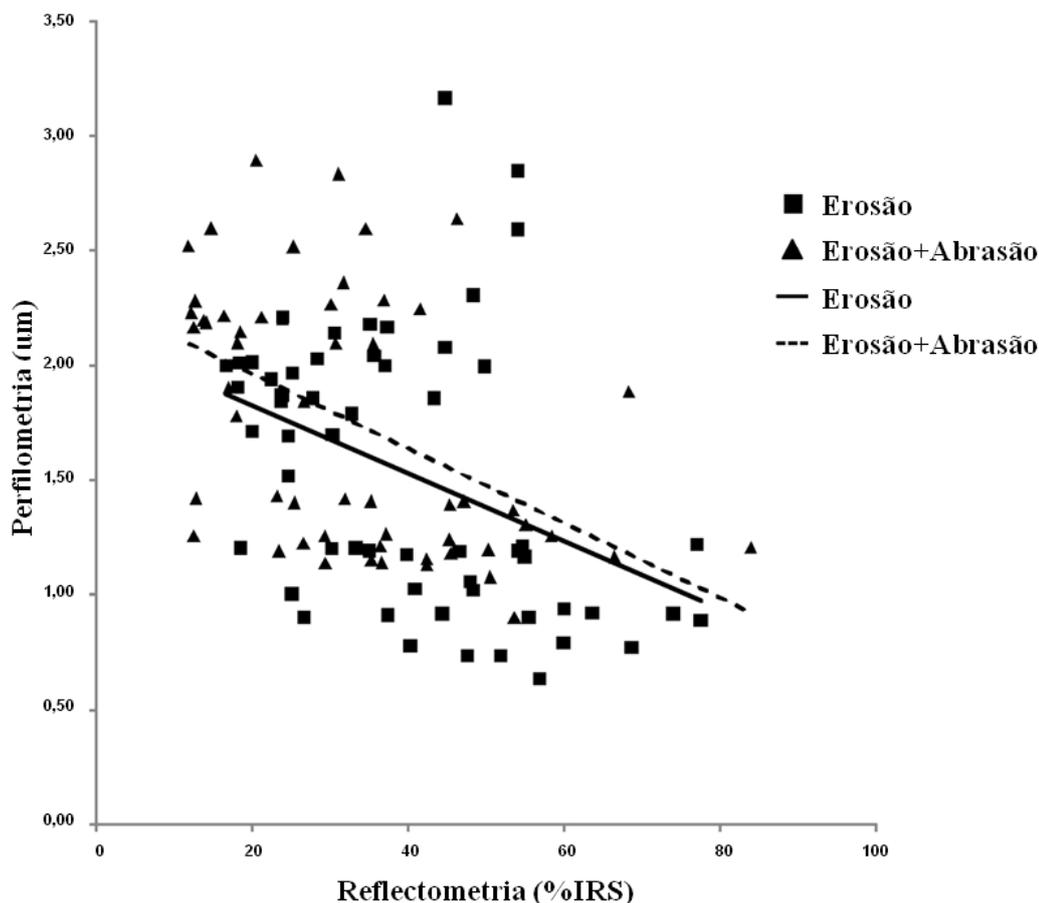


Figura 22. Correlação entre os métodos *in situ*. Análise por Perfilometria (desgaste calculado em μm pelo Perfilômetro de contato) e Reflectometria (desgaste calculado em %IRS pelo Reflectômetro Optipen) para erosão (linha sólida; $y=-0,0149x + 2,1231$) e erosão+abrasão (linha tracejada; $y=-0,0163x + 2,2887$).

8.6 DISCUSSÃO

Esta é a primeira vez que um estudo avalia o gel de quitosana contendo CaneCPI-5 para a prevenção do DDE do esmalte em condições clinicamente relevantes. No presente protocolo *in situ*, houve a presença de todos os participantes ao longo do estudo (em 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. O aparelho não foi usado durante a noite, pois o fluxo salivar durante esse período é baixo e não se espera que forneça reendurecimento adicional ao 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. Além disso, foram utilizados espécimes de esmalte bovino esterilizado, devido à grande quantidade necessária, e também pela boa aceitação dos mesmos em pesquisas envolvendo desgaste erosivo e adesão de proteínas salivares (LAURANCE-YOUNG *et al.*, 2011; PELÁ *et al.*, 2018). O resultado apresentado no capítulo 2 da presente tese foi levado em consideração para este capítulo, no qual demonstrou que o perfil proteômico da PAE formada *in situ* e *in vivo* é semelhante, especialmente considerando proteínas resistentes a ácidos, como as cistatinas (PELÁ *et al.*, 2020b).

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 PAE). Isso é importante porque no capítulo anterior (*in situ*), no qual foi utilizada uma solução contendo CaneCPI-5, os participantes aplicaram o líquido nas amostras por 1 min, 4 vezes ao dia, antes de cada desafio erosivo (PELÁ *et al.*, 2021b). 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 (HAWKINS *et al.*, 2003).

O presente estudo é um passo relevante para a aplicação clínica do gel de quitosana contendo CaneCPI-5. Em nosso primeiro estudo *in vitro* usando o gel, os espécimes de esmalte 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 desafio erosivo (SANTOS *et al.*, 2021). No presente capítulo *in situ*, os espécimes de esmalte bovino também foram submetidos a ácido cítrico 0,1% pH 2,5 por 90 s, 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 PAE. A variável de resposta para ambos os estudos foi a perfilometria de contato. O desgaste do esmalte do estudo *in vitro* realizado por Santos *et al.* (SANTOS *et al.*, 2021), o qual envolveu o grupo que não foi tratado, ou para os grupos que foram tratados com gel de quitosana, gel de quitosana + NaF ou gel de quitosana + CaneCPI-5 foi de $13,55 \pm 2,17$, $7,88 \pm 1,40$, $1,15 \pm 0,23$ e $1,01 \pm 0,32$ μm , respectivamente (SANTOS *et al.*, 2021). Por outro lado, os valores correspondentes para o presente estudo *in situ* foram $2,17 \pm 0,40$, $1,90 \pm 0,14$, $1,15 \pm 0,07$ e $0,85 \pm 0,08$ μm , respectivamente. Foi possível observar que no último estudo (presente capítulo) houve uma maior proteção do esmalte, principalmente para

os grupos que não foram tratados ou tratados com o gel placebo; isso pode ser devido: 1) à presença da PAE para proteção contra desgaste erosivo (HANNIG e HANNIG, 2014); 2) à capacidade tampão da saliva natural contra desafios ácidos (BUZALAF *et al.*, 2012a) e 3) a uma quantidade menor (em dia) de desafios erosivos.

Ainda em relação ao resultado da perfilometria (condição ERO), o grupo Gq+Cane apresentou uma maior proteção (significativa) quando comparado aos demais grupos; incluindo o 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 sua eficácia contra a desmineralização cariiosa (TEN CATE e BUZALAF, 2019), uma vez que a camada semelhante ao CaF₂ formada no esmalte é de curta duração sob a condição mais severa dos desafios erosivos. Até agora, a maior eficácia é vista para a combinação de fluoreto e estanho (HUYSMANS *et al.*, 2014; LUSSI *et al.*, 2019;). Isso pode ser a razão pela qual o estudo *in situ* anterior (capítulo 5) apresentou uma eficácia igual (sem diferença significativa) entre a solução comercial fluoretada (Elmex[®], contendo estanho e flúor) e a solução experimental contendo a CaneCPI-5 (PELÁ *et al.*, 2021b). Diferentemente, o presente estudo demonstrou diferenças entre os grupos Gq+NaF e Gq+Cane. Desta forma, o efeito preventivo da CaneCPI-5 pode estar relacionado à sua interação com a hidroxiapatita, alterando assim o perfil proteico da PAE (SANTIAGO *et al.*, 2017; CARVALHO *et al.*, 2020; ARAÚJO *et al.*, 2022). Outro aspecto digno de nota é a capacidade preventiva do grupo Gq (sem outros ingredientes ativos além da quitosana) (SANTOS *et al.*, 2021). Este gel demonstrou proteção significativa para o esmalte quando comparado ao grupo St. Isso pode ser devido à capacidade da quitosana de adsorver a hidroxiapatita e possivelmente se ligar as proteínas da PAE, prevenindo o desgaste erosivo (LEE *et al.*, 2012; BEKALE *et al.*, 2015; SANTOS *et al.*, 2021). Embora esse grupo tenha proporcionado certa prevenção ao desgaste do esmalte, ele pode ser considerado um gel placebo quando comparado aos demais grupos, que tiveram a presença de agentes ativos adicionais (CaneCPI-5 ou NaF).

Outra novidade do estudo foi avaliar o efeito preventivo dos géis frente aos desafios abrasivos. Esta condição foi realizada por meio 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).

No entanto, o presente protocolo alocou um tempo de 30 min entre o desafio erosivo e o desafio abrasivo. Este tempo foi importante para permitir algum grau de reendurecimento do esmalte, uma vez que durante o desafio erosivo ocorre a remoção de uma camada superficial de esmalte e a camada remanescente fica amolecida (LUSSI *et al.*, 2011).

Nossos resultados de perfilometria mostraram que a condição ERO+ABR foi capaz de promover um desgaste significativamente maior em relação à condição ERO. Esse resultado demonstra a padronização e o bom desempenho de todos os participantes na metodologia referente à abrasão. Além disso, o grupo Gq+Cane também levou à menor perda de esmalte em comparação com todos os outros grupos. A partir daí, o grau de proteção diminuiu significativamente para os grupos Gq+NaF, Gq e St, ou seja, os resultados para a condição ERO+ABR seguiram o mesmo padrão da condição ERO.

Notavelmente, este estudo também apresentou uma ferramenta de análise diferente para o DDE, ou seja, a análise pela intensidade de reflexão da superfície, avaliada pelo Reflectômetro Optipen. Este dispositivo, configurado em forma de caneta, foi empregado com sucesso em estudos de erosão *in vitro* (CARVALHO *et al.*, 2016a), e particularmente o capítulo 3 demonstrou o seu bom uso para o estudo envolvendo a proteção da CaneCPI-5 contra a erosão dentária *in vitro* (PELÁ *et al.*, 2021a). Já no capítulo 4 a técnica também foi bem desenvolvida, porém com um equipamento diferente (Reflectômetro de mesa) (PELÁ *et al.*, 2022). Como destaque, este é o primeiro estudo em que o dispositivo foi empregado sob um protocolo *in situ*. O grupo Gq+Cane obteve maior reflexão (o que significa proteção significativa contra o desgaste do esmalte) na condição ERO em comparação aos demais grupos. No entanto, não diferiu significativamente do Gq+NaF na condição ERO+ABR, assim como não houve diferença entre os grupos St e Gq (em ambas as condições). Apenas o grupo St apresentou diferença significativa entre ERO e ERO+ABR. Quando os resultados encontrados para o Reflectômetro são comparados com os obtidos com o Perfilômetro, fica evidente que esta última ferramenta analítica consegue discriminar melhor os distintos tratamentos. A falta de diferença apresentada pelo Reflectômetro pode ser explicada de duas maneiras: 1) Devido à grande quantidade de desafio erosivo (30 min) na superfície do esmalte, a análise de reflexão pode ter perdido a sensibilidade para detectar pequenas diferenças entre as condições e grupos de tratamentos (LUSSI *et al.*, 2012). Além disso, esse aspecto pode ter sido mais proeminente na condição ERO+ABR, pois na análise de perfilometria houve um maior desgaste do esmalte dentário; e 2) pela engenharia de película adquirida, que pode ter influenciado (obtendo uma maior reflexão, como discutido no capítulo 3) (PELÁ *et al.*, 2021a). Esta causa pode ser devido

à forte ligação da CaneCPI-5 à hidroxiapatita (SANTIAGO *et al.*, 2017), bem como à presença de outras proteínas da PAE na superfície do esmalte, principalmente na condição ERO, em que não houve desgaste mecânico causado pela escovação, mantendo, assim, as proteínas presentes na superfície do esmalte e, conseqüentemente, causando maior reflexão (LUSSI *et al.*, 2012; PELÁ *et al.*, 2021a;), enquanto que na condição de ERO+ABR pode não ter ocorrido esta interferência, dificultando a comparação entre as condições.

Devido a essas pequenas inconsistências entre os dados do Reflectômetro e os dados do Perfilômetro, tornou-se importante verificar a correlação entre estes métodos. Um estudo *in vitro* demonstrou que o Reflectômetro portátil se correlaciona com a dureza do esmalte, bem como as medições de liberação de cálcio, quando a erosão foi avaliada superficialmente (CARVALHO *et al.*, 2016a). Entretanto, ainda existia a falta da correlação entre a Reflectometria e a Perfilometria para os estudos envolvendo a erosão de forma mais severa (com perda da estrutura do esmalte). Diante disso, nossos resultados mostraram uma correlação significativa (negativa) entre as técnicas fornecidas pelo Reflectômetro portátil e o Perfilômetro de contato. Enquanto o Reflectômetro mostra números crescentes, indicando uma proteção, o Perfilômetro mostra números decrescentes, que também indicam proteção (menor perda de esmalte). Devido aos números opostos, essa correlação se torna negativa. Além disso, esta comparação deixou claro o potencial do uso do Reflectômetro Optipen para avaliar o desgaste do esmalte, desde estágios erosivos iniciais (como demonstrou a correlação entre a microdureza e análise de cálcio) (CARVALHO *et al.*, 2016a), e, agora, para estágios mais agressivos de erosão na forma mais próxima da condição clínica (como demonstrou neste capítulo a correlação entre a perfilometria e a reflectometria). É importante destacar que as limitações aqui apresentadas pelo Reflectômetro (perda de sensibilidade) dificilmente serão associadas para os estudos *in vivo*, devido ao grande desgaste causado no presente estudo *in situ*, que pode não ocorrer *in vivo*, por conta da progressão lenta do DDE. Além disso, os valores obtidos pelo Reflectômetro não são facilmente obtidos com exatidão para o desgaste (em μm) que ocorre na superfície do dente, pois o Reflectômetro avalia apenas a superfície exposta, sem considerar as camadas perdidas pelo desafio erosivo. Desta forma, a sequência lógica e futura será desenvolver um estudo *in vivo* para avaliar o papel protetor da CaneCPI-5 contra a erosão dentária inicial, utilizando o Reflectômetro Optipen como variável de resposta.

Vários pontos podem ser destacados do presente estudo: 1) o potencial do gel de quitosana (sem incorporação de nenhum outro princípio ativo) para proteger contra o DDE do esmalte; 2) os resultados satisfatórios de um gel de quitosana contendo NaF e, principalmente,

CaneCPI-5 para favorecer a redução do DDE do esmalte; 3) a prevenção do DDE do esmalte 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 o esmalte na condição ERO+ABR 5) a utilização de um equipamento capaz de avaliar o desgaste *in situ* e sua correlação com a perfilometria. Diante do exposto, a hipótese nula foi rejeitada.

8.7 CONCLUSÃO

Nossos resultados demonstraram que o gel de quitosana contendo CaneCPI-5 foi capaz de prevenir ERO e ERO+ABR no esmalte *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 DDE do esmalte. Por fim, serão desenvolvidas novas metodologias *in vivo* utilizando este equipamento portátil de reflexão, o qual parece ser capaz de avaliar a erosão dentária clinicamente.

A decorative flourish consisting of a long, thin, dark brown line that starts on the left, loops around the number '9.', passes through the word 'CAPÍTULO 7', and ends on the right with a large, stylized loop.

9. **CAPÍTULO 7**

**USO DO REFLECTOMETER E O EFEITO DA ENGENHARIA DE PELÍCULA
ADQUIRIDA COM CANECPI-5 NA EROSÃO INICIAL *IN VIVO***

9.1 INTRODUÇÃO

O sétimo capítulo encontra-se submetido ao Journal of Dental Research no ano de 2022. Este estudo está intitulado “Use of reflectometer and the effect of CaneCPI-5 on initial erosion *in vivo*”. A autoria está representada na seguinte ordem: Vinícius Taioqui Pelá, Talita Mendes Oliveira Ventura, Even Akemi Taira, Larissa Tercilia Grizzo Thomassian; Flávio Henrique Silva, Sonia Groisman, Thiago Saads Carvalho, Adrian Lussi, Marília Afonso Rabelo Buzalaf. (Ver a página inicial do artigo em APÊNDICE 7).

Nos últimos anos, o novo hábito alimentar da população se voltou para uma dieta com maior tendência à ingestão de ácidos, os quais entram em contato com a superfície dentária dentes e podem causar um processo de grande preocupação clínica na Odontologia (SCHLUETER *et al.*, 2020; VIEIRA-PEDROSA e DE MENEZES, 2020). Este processo erosivo no esmalte leva à desmineralização (hidroxiapatita e fluorapatita), causando um leve amolecimento da sua superfície. Se não houver inibição, ocorre a dissolução contínua das camadas subsequentes de cristais de esmalte, resultando em perda de volume da estrutura dentária. Dessa forma, a importância de intervenções contra esse desgaste é fundamental, pois sua prevalência e gravidade podem aumentar com o avançar da idade (JAEGGI e LUSSI, 2014).

Neste processo, a saliva é um fluido importante para a superfície do dente, com capacidade de atuar contra esse dano por várias de suas propriedades, destacando-se a sua capacidade de formar a PAE (BUZALAF *et al.*, 2012a). Essa camada orgânica é composta por certas proteínas (predominantemente de origem salivar) que estão diretamente associadas à proteção contra a dissolução do mineral do dente (CHAWHUAVEANG *et al.*, 2021). Dentre essas proteínas, a cistatina merece destaque devido à sua capacidade de resistência aos ácidos (DELECRODE *et al.*, 2015b). Posteriormente, tendo em vista um avanço científico na produção de proteínas recombinantes, nosso grupo de pesquisa desenvolveu a CaneCPI-5 e desenhou um protocolo com esse tratamento antes da formação da PAE (SANTIAGO *et al.*, 2017). Essa sequência de aplicação foi denominada engenharia de película adquirida (CARVALHO *et al.*, 2020; ARAÚJO *et al.*, 2022). Nesse caminho, os capítulos anteriores (*in vitro* e *in situ*) demonstraram a eficácia dessa proteína contra a erosão (PELÁ *et al.*, 2021a; PELÁ *et al.*, 2021b; PELÁ *et al.*, 2022; PELÁ *et al.*, 2022 *in press*). No entanto, faltam estudos *in vivo* capazes de demonstrar clinicamente o efeito protetor da CaneCPI-5. Até o momento, apenas dois estudos *in vivo* envolvendo essa proteína foram realizados, mas o foco esteve baseado em análises proteômicas (CARVALHO *et al.*, 2020; ARAÚJO *et al.*, 2022).

Assim, a falta de variáveis de resposta capaz de avaliar clinicamente a erosão dentária é a principal dificuldade nesta área de pesquisa. Isso traz um impacto direto no grau de evidência disponível para aconselhar os pacientes sobre a prevenção da erosão (JOSHI *et al.*, 2016). Com essa limitação em mente, algumas técnicas analíticas foram testadas para avaliar clinicamente a erosão, como tomografia de coerência óptica (CHAN *et al.*, 2013; TSAI *et al.*, 2019), fluorescência de luz quantitativa (STOOKEY, 2004; ABAL *et al.*, 2017) e o método de imagem por reflectância de infravermelho (WU e FRIED, 2009; FRIED *et al.*, 2013). Como destaque, um dispositivo (chamado Reflectômetro Optipen) foi projetado com potencial para o uso clínico devido ao seu fácil manuseio (RAKHAMATULINA *et al.*, 2013). Além disso, os resultados obtidos com a reflectometria correlacionaram-se com as importantes técnicas de avaliação da erosão dentária *in vitro*, como a medida de dureza superficial e liberação de cálcio (CARVALHO *et al.*, 2016a). Recentemente, este dispositivo foi utilizado com sucesso para avaliar o efeito da CaneCPI-5 em protocolo *in vitro* (PELÁ *et al.*, 2021a) e *in situ* (PELÁ *et al.*, 2022 *in press*). Além disso, neste último estudo referente ao capítulo anterior, a análise de reflectometria pelo Reflectômetro Optipen apresentou correlação com a perfilometria de contato, sugerindo que este dispositivo poderia ser empregado com sucesso em uma metodologia *in vivo* para avaliar o tratamento com CaneCPI-5 contra a erosão dentária.

Diante do exposto, duas questões merecem atenção para o presente estudo: 1) a novidade de usar o Reflectômetro Optipen clinicamente e 2) a falta de resultados *in vivo* com a CaneCPI-5 contra a erosão dentária inicial.

9.2 OBJETIVO

O objetivo deste capítulo foi utilizar clinicamente o Reflectômetro Optipen para avaliar a engenharia de película adquirida com uma solução de bochecho contendo CaneCPI-5 para a prevenção da erosão inicial.

9.3 HIPÓTESES NULAS

As hipóteses nulas testadas foram: 1) o Reflectômetro Optipen não é capaz de detectar clinicamente a erosão dentária inicial; 2) a engenharia de película adquirida com uma solução de bochecho contendo CaneCPI-5 não previne a erosão dentária inicial.

9.4 MATERIAL E MÉTODOS

9.4.1 Delineamento experimental

A CaneCPI-5 foi produzida na Universidade Federal de São Carlos e o protocolo *in vivo* foi desenvolvido na Faculdade de Odontologia de Bauru (Universidade de São Paulo), sendo aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos local (CAAE: 56867722.3.0000.5417, ver ANEXO 1). Todos os participantes assinaram previamente o termo de consentimento livre e esclarecido, seguindo as diretrizes da Declaração de Helsinque. O protocolo experimental foi realizado de forma cruzada (três fases de tratamento) e triplo-cego (participantes, pesquisadores e analistas). Todos os participantes estiveram presentes em todas as fases do estudo. O protocolo foi realizado apenas no período da manhã. Cada fase do estudo ocorreu em um dia da semana (quarta-feira) e houve um intervalo de 10 dias entre as fases.

9.4.2 Seleção dos participantes

Foram selecionados nove participantes com idade entre 25 e 30 anos, de ambos os sexos (5 mulheres e 4 homens), com bom estado geral de saúde (critérios de inclusão: não fumantes, sem uso constante de medicamentos, mulheres não grávidas e livres de doenças sistêmicas). Além disso, os participantes foram selecionados quanto à boa saúde bucal (critérios de inclusão: sem gengivite, periodontite, qualquer outra condição bucal que pudesse afetar a composição da saliva, bem como a presença de restaurações nas superfícies vestibulares dos dentes superiores). Participantes com fatores de risco para DDE, ou seja, com consumo excessivo de bebidas gaseificadas, sucos de frutas ou frutas ácidas, nadadores ou pacientes com distúrbios gástricos (bulimia e refluxo gastroesofágico) foram excluídos após anamnese e avaliação clínica. Outro critério de exclusão foi baseado no fluxo salivar de cada participante, cujo fluxo não estimulado e estimulado foi limitado a ser maior que 0,3 e 1,0 mL/min, respectivamente. O tamanho da amostra foi escolhido com base em estudo prévio *in vivo* (CARVALHO *et al.*, 2020), considerando-se uma diferença mínima detectável na liberação de Ca de 1,26 mM e desvio padrão de 0,35 mM, para um erro α de 5% e um erro β de 20%.

9.4.3 Orientações aos participantes

Todos os participantes receberam as seguintes orientações: 1) Tomar café da manhã antes da higienização da cavidade oral; 2) Utilizar exclusivamente o kit fornecido pelos pesquisadores, contendo uma 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 fluoreto (1100 ppmF, NaF; Oral B[®], The Procter & Gamble Company, Cincinnati, OH, EUA) durante todo o estudo; 3) Não comer e beber durante a formação do PAE *in vivo*; 4) Não utilizar procedimentos de clareamento ou aplicação profissional de fluoreto (PELÁ *et al.*, 2021b).

9.4.4 Produção recombinante da CaneCPI-5

A CaneCPI-5 foi produzida de forma recombinante em *Escherichia coli* Rosetta, conforme descrito no capítulo 3 (SOARES-COSTA *et al.*, 2022; SANTIAGO *et al.*, 2017; PELÁ *et al.*, 2021a).

9.4.5 Tipos de tratamentos na forma de bochecho

Os participantes estiveram presentes em 3 fases cruzadas e triplo-cegas. Para cada fase, 3 participantes foram destinados a um dos 3 grupos de tratamento (determinados por números computadorizados aleatoriamente), sendo: 1) Água deionizada, pH 7,5 (controle negativo; Água); 2) Solução comercial contendo 800 ppm Sn²⁺ de SnCl₂, 125 ppm F⁻ de fluoreto de amina e 375 ppm F⁻ de fluoreto de sódio (SnCl₂/AmF/NaF), pH 4,5, Elmex[®] - GABA International AG, Therwil, BL, Suíça (controle positivo; Elmex[®]); 3) 0,1 mg/mL da CaneCPI-5 preparada em água deionizada, pH 7,8 (Solução experimental; CaneCPI-5). (SANTIAGO *et al.*, 2017).

9.4.6 Protocolo experimental *in vivo*

Em cada dia, os participantes receberam profilaxia dentária com pedra pomes para remover a PAE. Os procedimentos nas superfícies dos dentes *in vivo* (incisivos centrais superiores esquerdo e direito) também foram cruzados em uma das três porções (próximo à gengiva, mediana e distal do dente). Assim, todos os tratamentos aconteceram igualmente em todas as regiões do dente. A intensidade de reflexão da superfície inicial (IRSi) foi medida por

um Reflectômetro portátil Optipen (veja detalhes da análise na seção abaixo). Em seguida, cada participante realizou um bochecho (1 min; 10 mL) com a respectiva solução da fase em que cada participante estava inserido. Depois, a PAE foi formada *in vivo* por 120 min. Após este período, os dentes foram lavados (5 s) e secos (3 s). Imediatamente, um molde de cera foi fixado no incisivo central superior esquerdo e direito em formato circular (com o centro exposto por um orifício de 3 mm²). Então, o desafio erosivo foi realizado individualmente em cada dente. Para isso, 10 µL de ácido cítrico a 1% (pH 2,5) foram aplicados (com pipeta) na superfície exposta do dente por 10 s (no centro do molde de cera). Em seguida, o ácido cítrico foi coletado e armazenado (-80 °C) para análise de cálcio liberado no ácido cítrico (CARVALHO *et al.*, 2020). Subsequentemente, os dentes foram lavados (5 s) e secos (3 s). Após esses procedimentos, a intensidade de reflexão da superfície final (IRSf) foi realizada exatamente onde ocorreu o *baseline* e o desafio erosivo (Figura 23).

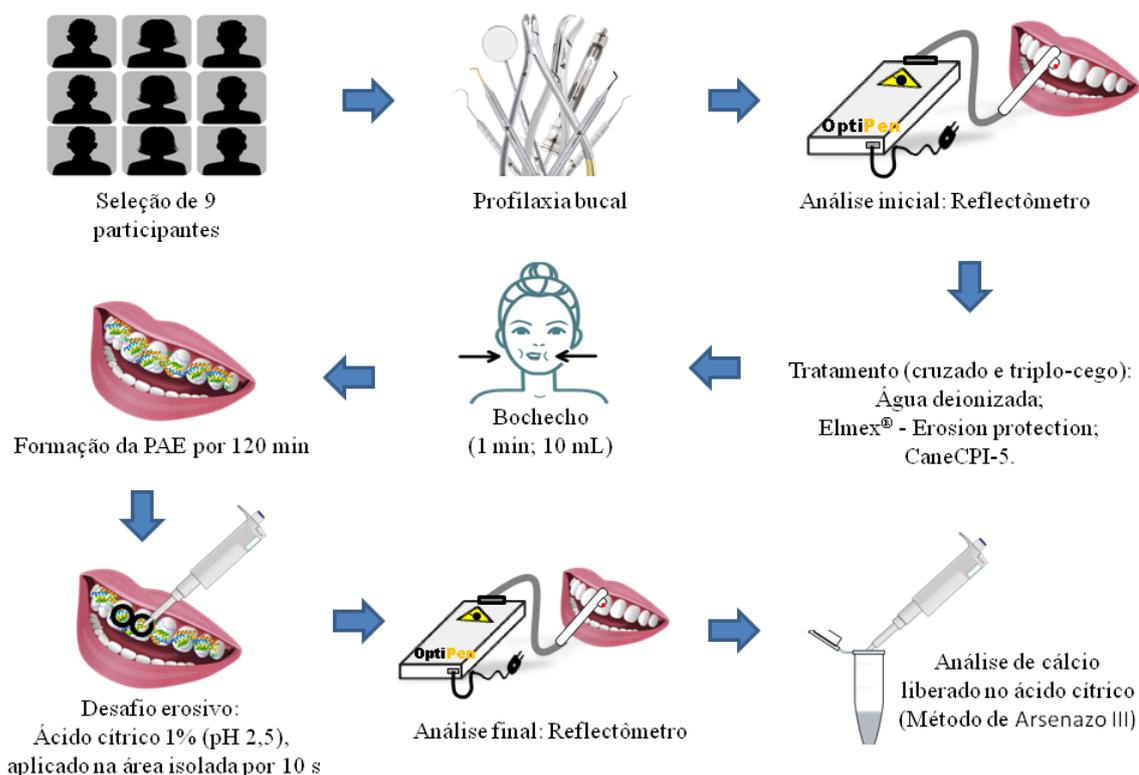


Figura 23. Esquema metodológico *in vivo*. Demonstração da seleção de 9 participantes, seguido pela profilaxia e análise inicial pelo Reflectômetro. Posteriormente, a realização do tratamento (Água, Elmex® ou CaneCPI-5), formação da PAE e desafio erosivo com ácido cítrico. Por fim, análise final pelo Reflectômetro e análise de cálcio.

9.4.8 Medição da erosão dentária pelo Reflectômetro Optipen

A intensidade de reflexão da superfície (IRS) foi realizada pelo Reflectômetro portátil Optipen. A análise inicial (IRSi) foi feita antes do tratamento, já a análise final (IRSf) foi feita após o desafio erosivo. Para ambas as análises (inicial e final), todas as superfícies de esmalte foram previamente secas por 3 s. Posteriormente, a ponta do Reflectômetro foi tocada na superfície do esmalte. Em seguida, o equipamento portátil foi inclinado em vários ângulos para obter o maior registro de reflexão de cada área da superfície do dente. Os valores apresentados pelo *software* foram tabulados e calculados da seguinte forma: $\%IRS = (IRSf / IRSi) \times 100$ (CARVALHO *et al.*, 2016a; PELÁ *et al.*, 2021a).

9.4.9 Análise de cálcio pelo método colorimétrico de Arsenazo III

A quantidade de cálcio presente no ácido cítrico foi analisada individualmente, pelo método Arsenazo III (VOGEL *et al.*, 2006). Para isso, foi construída uma curva de calibração contendo diferentes concentrações de cálcio. A absorbância foi analisada a 25 °C, a 650 nm. A análise foi realizada em triplicata, usando um espectrofotômetro (Thermo Fisher Scientific, Konica Minolta, EUA).

9.4.10 Análise estatística

Os resultados obtidos a partir do Reflectômetro Optipen e da análise de cálcio (média das duas superfícies obtidas do incisivo direito e esquerdo de cada participante) foram verificados estatisticamente, utilizando o *software* GraphPad Prism (versão 6.0 para Windows, GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, EUA), com relação à normalidade (teste de Kolmogorov-Smirnov) e homogeneidade (teste de Bartlett). Os dados foram analisados pelo teste Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn. Os resultados foram apresentados como (mediana; intervalos de confiança de 95% (IC)). O coeficiente de correlação de Spearman foi calculado entre Reflectometria (%IRS) e concentração de cálcio liberada do esmalte (mM). O nível de significância foi estabelecido em 5%.

9.5 RESULTADOS

9.5.1 Medição da erosão dentária pelo Reflectômetro Optipen

Os resultados da %IRS (mediana; IC 95%) mostraram que a proteção conferida pelo grupo da água (controle negativo) (%IRS: 57,73; 47,57 – 67,54) foi significativamente menor em comparação aos demais grupos. A melhor proteção (menor mudança na reflexão, apresentando maiores valores de %IRS) foi observada para os grupos Elmex[®] (74,69%; 65,50 – 86,44) e CaneCPI-5 (80,20%; 67,74 – 89,05), sem diferenças significativas entre eles ($p < 0,05$) (Figura 24).

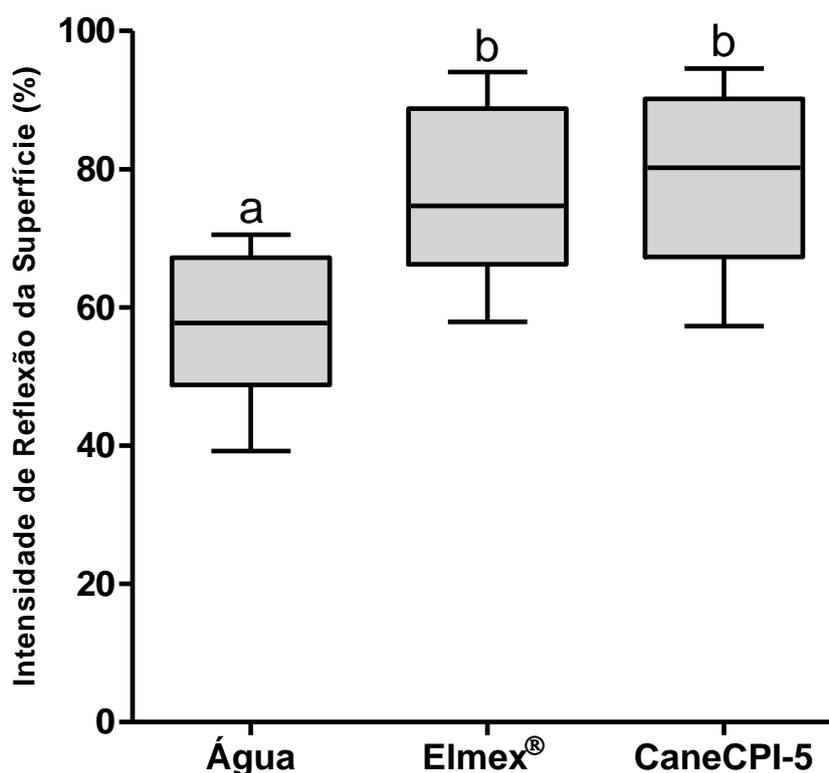


Figura 24. Porcentagem de intensidade de reflexão do esmalte *in vivo* avaliada pelo Reflectômetro Optipen. Tratamento em forma de bochecho com Água, Elmex[®] ou CaneCPI-5, seguido pela formação da PAE e desafio erosivo com ácido cítrico 1% pH 2,5 por 10 s. Letras distintas denotam diferenças significativas entre os tratamentos ($p < 0,05$, $n=9$).

9.4.2 Análise de cálcio liberado no ácido cítrico

A análise de cálcio em mM (mediana; IC 95%) demonstrou menor proteção (maior liberação de cálcio no ácido cítrico) para o grupo Água (1,24; 0,87 – 1,53). A melhor proteção (menor liberação de cálcio) foi observada para os grupos Elmex[®] (0,43; 0,30 – 0,69) e CaneCPI-5 (0,56; 0,20 – 0,93), sem diferenças significativas entre eles ($p < 0,05$) (Figura 25).

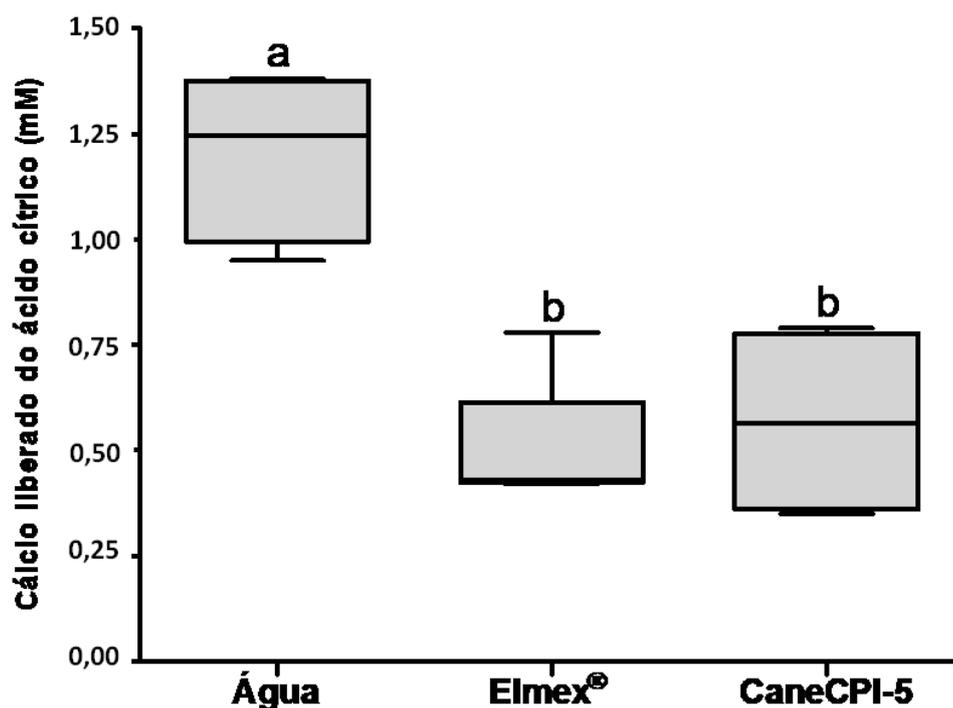


Figura 25. Análise do Cálcio (mM) liberado no ácido cítrico. Tratamento em forma de bochecho com Água, Elmex® ou CaneCPI-5, seguido pela formação da PAE e desafio erosivo com ácido cítrico 1% pH 2,5 por 10 s. Letras distintas denotam diferenças significativas entre os tratamentos ($p < 0,05$, $n = 9$).

9.5.3 Correlação entre a reflectometria e a liberação de cálcio para o ácido cítrico

Houve correlação significativa ($r = -0,4522$, $p = 0,0013$), entre a reflectometria demonstrada pela %IRS (Reflectômetro Optipen) e liberação de cálcio (mM) no ácido cítrico pelo método de Arsenazo III (Figura 26).

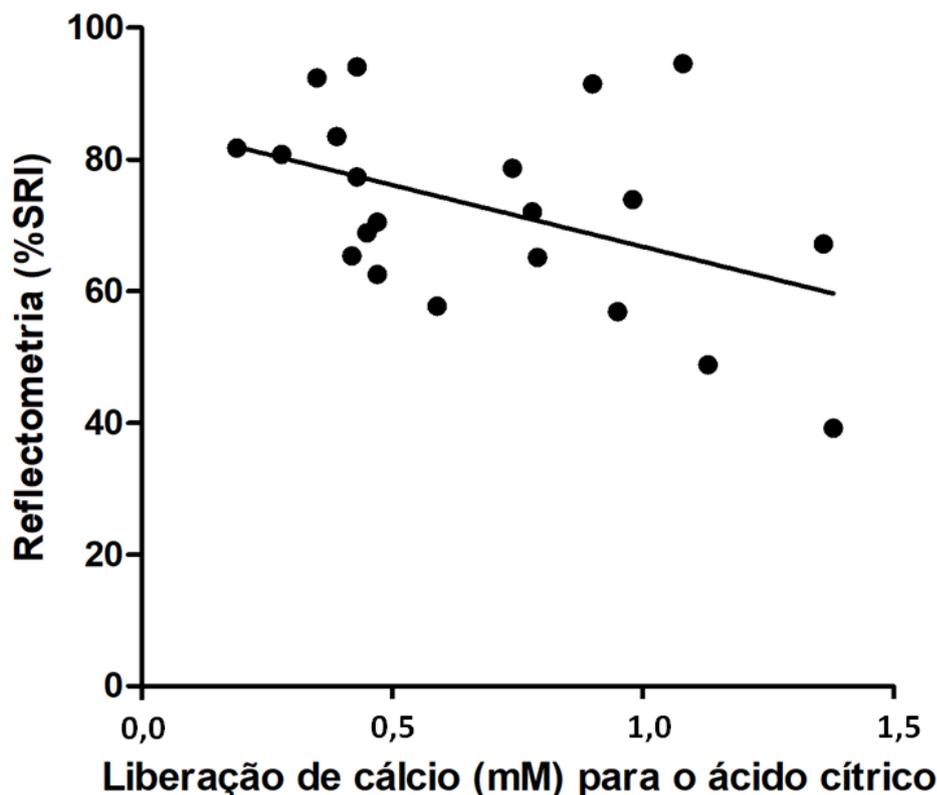


Figura 26. Correlação entre os métodos *in vivo*. Reflectometria (desgaste calculado em %IRS pelo Reflectômetro Optipen) e liberação de cálcio (mM) para o ácido cítrico (calculado pelo método de Arsenazo III). (linha sólida; $y = -0.0069x + 1.1706$).

9.6 DISCUSSÃO

Este é o primeiro estudo capaz de analisar o efeito preventivo da CaneCPI-5 *in vivo* pelo Reflectômetro Optipen. Até o momento, este dispositivo não havia sido usado para avaliar clinicamente a erosão dentária inicial. Para isso, o presente estudo foi desenvolvido como uma prova de conceito dos resultados preliminares envolvendo CaneCPI-5, tendo em vista que nosso objetivo final é desenvolver um protocolo odontológico para o uso da população por meio de um enxaguatório bucal contendo esta proteína.

Inicialmente, para a real interpretação dos resultados, alguns aspectos metodológicos merecem explicação. A concentração da CaneCPI-5 (0,1 mg/mL) foi baseada em nosso primeiro estudo, o qual demonstrou que o aumento da concentração da CaneCPI-5 não aumentou a sua proteção para a superfície do esmalte (SANTIAGO *et al.*, 2017). Além disso, nessa concentração e com esse tempo de enxágue (1 min), o quinto capítulo demonstrou que este protocolo foi seguro para a cavidade oral dos participantes deste capítulo, pois essa proteína não apresentou efeito citotóxico para as células de fibroblastos gengivais (PELÁ *et al.*, 2021b).

Além disso, não houve queixas de sabor e odor para nenhum dos tratamentos utilizados. Em relação ao número de participantes, o cálculo do tamanho da amostra foi baseado em estudo anterior do nosso grupo, no qual a variável resposta foi o cálcio liberado do esmalte após o bochecho com CaneCPI-5 e o desafio com ácido cítrico (CARVALHO *et al.*, 2020), semelhante para o desafio realizado no presente estudo. Também é importante mencionar que a escolha dos dentes analisados se deu em função de sua posição anatômica e do seu tamanho (incisivos centrais superiores), o que permitiu o isolamento do desafio erosivo e, posteriormente, a coleta de ácido cítrico para análise de cálcio. Para evitar que o tratamento não fosse realizado no mesmo local do tratamento anterior, a área da superfície do dente foi dividida em três porções com base na localização gengival (proximal, medial e distal). Assim, cada porção foi destinada a cada uma das fases (seguindo o desenho cruzado), para que todos os tratamentos ocorressem em todas as porções do dente. Isso também foi importante para anular o possível efeito do fluido crevicular, que pode ter mais influência na região proximal do dente (ODANAKA *et al.*, 2020).

A principal novidade deste estudo foi a utilização do Reflectômetro Optipen em um protocolo *in vivo* de erosão dentária inicial. O dispositivo é composto por uma medição com ângulos de incidência e reflexão de 45 graus, uma lâmpada halógena e o espectrômetro, a fim de demonstrar que, quanto maior a reflexão, maior a proteção da superfície analisada contra a desmineralização. Também possui um *design* de fibra óptica com cabeçote de medição de 15 mm para garantir o acesso a todas as posições dentro da cavidade oral. A forma de caneta proporciona um manuseio fácil e leve. Além disso, um *software* foi criado para proporcionar uma leitura rápida e fácil do sinal obtido, contribuindo para a redução do tempo de análise. Para fins de validação, foi observada uma correlação significativa entre %IRS e cálcio liberado do esmalte. Esta correção segue a mesma linha com um estudo *in vitro* anterior, o qual correlacionou a microdureza de superfície e a análise de cálcio (CARVALHO *et al.*, 2016a). Assim, a primeira hipótese nula foi rejeitada. É importante destacar que a correlação entre %IRS e liberação de cálcio do esmalte foi negativa. Isso se deve ao fato de que, no caso do Reflectômetro, valores maiores de %IRS significam menor erosão, ao contrário do que ocorre no caso da liberação de cálcio (maiores quantidades de cálcio liberadas significam maior erosão).

Os resultados obtidos no presente estudo com o bochecho da CaneCPI-5 constituem um importante avanço clínico para a prevenção da erosão dentária inicial, uma vez que este tratamento foi semelhante ao grupo controle positivo (Elmex[®] - Erosion Protection). Especificamente para os resultados de %IRS, os bochechos com CaneCPI-5 e Elmex[®]

obtiveram maior reflexão, o que significa uma maior proteção contra a erosão quando foram comparados ao grupo Água. Assim, nossa segunda hipótese nula também foi rejeitada. É importante mencionar que essa reflexão no esmalte pode ter sofrido duas influências: 1) a alta força de ligação da CaneCPI-5 à hidroxiapatita (SANTIAGO, *et al.*, 2017), aumentando a reflexão (PELÁ *et al.*, 2021a) e 2) a solução Elmex[®] contém em sua fórmula SnCl₂/NaF/AmF, que tende a interagir com a PAE e modificá-la, levando a uma maior abundância de proteínas e conseqüentemente também aumentando a reflexão (LUSSI *et al.*, 2012). Essas influências podem ter ocorrido mesmo após a lavagem com água deionizada e o desafio erosivo. Também é importante lembrar da ausência da aplicação da solução de hipoclorito de sódio antes da análise final pelo Reflectômetro Optipen. Em estudos *in vitro* anteriores, essa aplicação serviu para remover qualquer resíduo de tratamento e/ou proteínas remanescentes da PAE (PELÁ *et al.*, 2021a; PELÁ *et al.*, 2022). No entanto, a decisão de não aplicar hipoclorito de sódio neste estudo foi importante para garantir a segurança dos tecidos da cavidade oral dos participantes. Por outro lado, os resultados de liberação de cálcio corroboraram com os resultados do Reflectômetro, indicando que, se essas deficiências ocorreram, elas foram de menor relevância.

Além disso, resultados anteriores com esses tratamentos e utilizando o Reflectômetro Optipen indicam que a análise foi eficaz. Nesse sentido, o capítulo 3 (*in vitro*) avaliou o mecanismo de proteção da CaneCPI-5 contra a erosão dentária inicial pelo Reflectômetro. A reflexão para este tratamento foi de 85% (PELÁ *et al.*, 2021a), que obteve uma reflexão maior em relação ao presente tratamento (80,20%). A explicação para isso pode estar relacionada ao tempo de aplicação da CaneCPI-5 (estudo *in vitro* 2 h *versus* o presente estudo 1 min). Posteriormente, o capítulo 6 (*in situ*) envolveu o efeito preventivo do um gel de quitosana contendo CaneCPI-5 e também foi avaliado com sucesso pelo Reflectômetro Optipen, em um modelo de erosão mais severo. O resultado da reflexão do grupo de aplicação do gel de quitosana contendo CaneCPI-5 foi de 56,42% (PELÁ *et al.*, 2022 *in press*). Esse valor é menor em relação ao resultado atual do bochecho com CaneCPI-5 (80,20%) devido à quantidade de desafio realizado no estudo *in situ* (total de 30 min), enquanto no presente estudo a quantidade de desafio erosivo foi muito inferior (apenas 1 min). Além disso, neste capítulo *in situ* também houve uma boa correlação (significativa) entre o reflectometria e a perfilometria de contato, sugerindo a execução da análise pelo Reflectômetro em um protocolo *in vivo* (PELÁ *et al.*, 2022 *in press*), o que foi realizado no presente estudo.

Ambos os grupos (CaneCPI-5 e Elmex[®]) mostraram-se eficazes para superfícies de esmalte; no entanto, seus mecanismos de proteção diferem. Para o grupo CaneCPI-5, a

explicação se dá pela alta força de ligação à hidroxiapatita, avaliada por microscopia de força atômica (SANTIAGO, *et al.*, 2017). Além disso, o efeito protetor da CaneCPI-5 também se mostrou eficaz em estudos *in situ* com erosão mais severa, mesmo seguindo com a associação de efeitos abrasivos, onde há perda de camadas de esmalte (PELÁ *et al.*, 2021b; PELÁ *et al.*, 2022 *in press*). Para o grupo Elmex[®], a literatura tem demonstrado que seu mecanismo de proteção está associado à combinação de fluoreto e estanho, que reagem com a hidroxiapatita, reduzindo a solubilidade do esmalte e protegendo contra a desmineralização (HUYSMANS *et al.*, 2014). Além disso, este produto comercial é muito utilizado em estudos envolvendo erosão dentária (como controle positivo) devido à sua capacidade protetora. Este aspecto foi evidenciado no capítulo 4 e 5 (DE SOUZA *et al.*, 2018; PELÁ *et al.*, 2021b; PELÁ *et al.*, 2022). No entanto, seu uso em longo prazo pode causar descoloração na superfície do esmalte e sensações adstringentes no indivíduo (WEST *et al.*, 2012). Este fato, somado à necessidade da combinação de vários componentes (SnCl₂/NaF/AmF), o torna uma desvantagem quando comparado ao bochecho com CaneCPI-5.

O resultado da análise de cálcio pelo método colorimétrico por Arsenazo III confirmou novamente (para o Reflectômetro Optipen) que CaneCPI-5 e Elmex[®] reduzem a desmineralização do esmalte. A quantidade de cálcio obtida no presente estudo foi semelhante ao estudo anterior (CARVALHO *et al.*, 2020). No entanto, é importante mencionar que a PAE também é composta por uma quantidade de cálcio, que pode aumentar devido ao procedimento da engenharia de película adquirida, uma vez que essa camada fica mais reforçada contra a erosão dentária (PELÁ *et al.*, 2021a; PELÁ *et al.*, 2022). Portanto, nesta análise, pode ter ocorrido uma pequena influência da quantidade de cálcio presente na própria PAE.

Por fim, no presente capítulo a engenharia de película adquirida também merece ser levada em consideração. Esse procedimento, caracterizado pela aplicação do bochecho antes da formação da PAE, pode ter favorecido o nível de prevenção contra a erosão. Estudos anteriores *in vitro* e *in situ* confirmam esse efeito benéfico no esmalte dentário (SANTIAGO *et al.*, 2017; PELÁ *et al.*, 2021a; PELÁ *et al.*, 2021b; PELÁ *et al.*, 2022; PELÁ *et al.*, 2022 *in press*). Além disso, estudos envolvendo esse conceito no campo da análise proteômica demonstraram que o tratamento *in vivo* com CaneCPI-5 (na forma de bochecho) aumentou a quantidade de importantes proteínas da PAE. Esse processo ocorre devido ao fortalecimento da camada basal da PAE com CaneCPI-5. Posteriormente, outras proteínas da PAE se ligam às proteínas existentes, resultando em uma película com maior quantidade de proteínas ácido-resistentes, como a proteína S100-A9, lisozima e cistatinas (CARVALHO *et al.*, 2020;

ARAÚJO *et al.*, 2022). Se, por um lado, há conhecimento proteômico das alterações da PAE com CaneCPI-5, por outro, ainda não está clara a alteração do perfil proteômico da PAE quando a solução comercial Elmex[®] é utilizada como enxaguatório. Isso merece ser avaliado no futuro.

9.7 CONCLUSÃO

Estes resultados demonstraram que o Reflectômetro Optipen foi uma excelente ferramenta para avaliar clinicamente os efeitos preventivos do bochecho com CaneCPI-5 por meio da engenharia de película adquirida contra a erosão dentária inicial.

10. DISCUSSÃO GERAL DOS RESULTADOS OBTIDOS NA TESE

A presente tese permitiu um avanço para a aplicação clínica da CaneCPI-5. Desta forma, para que pudéssemos alcançar este passo, foi necessária uma sequência de estudos. Assim, o primeiro capítulo foi voltado para a compreensão do perfil proteômico da PAE *in vitro*, uma vez que este protocolo nunca havia sido desenvolvido no nosso laboratório, devido à dificuldade para identificar as proteínas por espectrometria de massa. Esta limitação foi superada diante da troca de saliva no período da formação da PAE *in vitro*, garantindo uma ótima identificação na sua quantidade e na sua qualidade de proteínas (PELÁ *et al.*, 2020a). Entretanto, neste estudo não foi avaliada a diferença de expressão, devido ao baixo valor obtido pela quantificação de proteínas, visto que para realizar esta comparação é necessário que todos os grupos estejam na mesma concentração. Diante desta preocupação em não obter a quantidade mínima necessária para uma adequada identificação de proteínas por espectrometria de massa, os resultados foram apresentados apenas com foco no perfil qualitativo da PAE *in vitro*. Além disso, este capítulo foi importante para permitir uma real comparação do perfil proteômico da PAE *in vitro*, *in situ* e *in vivo*, como sugerido no segundo capítulo. Nestas analogias, foram identificadas importantes diferenças no perfil da PAE entre as três condições, as quais serviram de fundamento para a extrapolação dos resultados obtidos pelos protocolos iniciais (*in vitro* e *in situ*) em comparação com uma condição clínica, principalmente ao associar o campo emergente da erosão dentária (PELÁ *et al.*, 2020b).

Sem dúvida, os dois primeiros capítulos voltados para o conhecimento da PAE também foram fundamentais por se tratar de uma linha de pesquisa que atua em conjunto com a engenharia de película adquirida. Este termo foi nomeado em virtude do fortalecimento que ocorre na PAE por meio dos tratamentos descritos nesta tese, envolvendo proteínas/peptídeos: hemoglobina, estaterina e, principalmente, a CaneCPI-5 (PELÁ *et al.*, 2021a). Estes componentes, juntamente com o procedimento da engenharia de película adquirida, foram verificados no terceiro capítulo, em relação aos seus específicos mecanismos de ação sobre a superfície nativa do esmalte humano *in vitro*. Diante deste contexto, foram observados diferentes mecanismos de proteção contra a erosão, ou seja, houve tratamentos com melhor atuação quando aplicados diretamente na superfície do esmalte e/ou tratamentos quando associado à PAE (PELÁ *et al.*, 2021a).

Apesar do segundo capítulo demonstrar que várias proteínas típicas da PAE foram subexpressa na condição *in vitro* em comparação com as demais condições, como por exemplo,

a cistatina (PELÁ *et al.*, 2020a), nós acreditamos que a engenharia de película adquirida com os tratamentos possa ter fortalecido esta camada orgânica, ajudando na proteção contra a erosão dentária (PELÁ *et al.*, 2021a). Ainda é importante destacar que a CaneCPI-5 é uma cistatina diferente daquela que foi subexpressa na condição *in vitro* (cistatina humana). Por outro lado, o tratamento com hemoglobina e estaterina para a proteção contra a erosão dentária *in vitro*, pode ser reprodutível para uma situação clínica, uma vez que estas proteínas foram superexpressas na condição *in vitro* quando comparada as demais condições (*in situ* e *in vivo*) (PELÁ *et al.*, 2020b), mas vale lembrar que os tratamentos proteicos do terceiro capítulo foram sintetizados ou comercializados (PELÁ *et al.*, 2021a). Ainda neste capítulo, duas novas abordagens tiveram destaques. A primeira foi a implementação de uma nova técnica para avaliar a erosão dentária por meio da reflexão da superfície, usando o Reflectômetro Optipen. A segunda abordagem foi o uso de uma combinação de todas as proteínas ou peptídeo descritos acima (CaneCPI-5, hemoglobina e peptídeo derivado da estaterina), a fim de potencializar o efeito protetor contra a erosão dentária (PELÁ *et al.*, 2021a).

Por este caminho promissor, no quarto capítulo foi desenvolvido uma solução de tratamento, usando uma combinação com componente orgânico (CaneCPI-5) e inorgânico (NaF), os quais favoreceram a proteção contra a erosão dentária *in vitro* (PELÁ *et al.*, 2022). Ainda neste estudo, foi utilizado o enxaguatório comercial (Elmex[®] - erosion protection) porque em sua composição também existe uma combinação, entretanto de componentes inorgânicos (SnCl₂/NaF/AmF). Para a nossa surpresa, a análise de microdureza de superfície mostrou que o grupo da combinação (envolvendo CaneCPI-5 e NaF) obteve um melhor resultado que o produto comercial. Outro aspecto relevante foi a aplicação do tratamento por apenas 2 min, tempo mais realístico para uma situação clínica (PELÁ *et al.*, 2022) em comparação ao protocolo de 2 h do capítulo 3 (PELÁ *et al.*, 2021a). Esta diferença no tempo de aplicação do tratamento foi um dos aspectos mais importantes quando comparamos os resultados do grupo da CaneCPI-5 por meio da análise do Reflectômetro, ou seja, no terceiro capítulo a %IRS foi de aproximadamente 85%, enquanto no quarto capítulo a %IRS foi de aproximadamente 20%.

Para seguir o avanço clínico do uso da CaneCPI-5 contra a erosão dentária, a primeira parte do quinto capítulo foi executada para garantir a segurança desta proteína para as células da cavidade oral (fibroblastos gengivais humanos) em pequenas e grandes concentrações, bem como em curto e longo tempo de exposição (PELÁ *et al.*, 2021b). Este foi um importante passo para demonstrar que nenhum efeito citotóxico pudesse ocorrer na segunda parte do quinto capítulo, o qual foi constituído por uma metodologia *in situ* (com 15 participantes), para

verificar o efeito protetor da CaneCPI-5 em desgastes erosivos mais severos, associando, também, o desgaste abrasivo, uma vez que estes episódios são comumente associados em uma situação clínica. Mesmo sendo uma aplicação de tratamento com o volume reduzido sobre as amostras (forma de gota com aproximadamente 50 µL cada amostra), o tratamento com a CaneCPI-5 foi eficaz para os desgastes no esmalte (erosão e erosão+abrasão) (PELÁ *et al.*, 2021b).

Pensando sobre as diferentes formas de aplicação da CaneCPI-5, como demonstrado nos capítulos anteriores (enxaguatório e gota), o sexto capítulo tomou a atenção para desenvolver um novo veículo de aplicação por meio da incorporação da CaneCPI-5 em gel de quitosana, sob um protocolo de erosão e abrasão *in situ* (PELÁ *et al.*, 2022 *in press*). O efeito protetor deste tratamento (gel de quitosana contendo CaneCPI-5) foi significativamente melhor em comparação com todos os outros géis deste estudo pela análise de perfilometria. Também é importante mencionar que o gel de quitosana (placebo), sem adição de nenhum outro princípio ativo, já demonstrou um efeito protetor para o esmalte. Porém, quando comparamos o desgaste ocorrido no esmalte do presente capítulo (aplicação em gel) com o capítulo anterior (aplicação de gota) (PELÁ *et al.*, 2021b), podemos observar que o tratamento com gota demonstrou uma menor perda da estrutura do esmalte dentário em comparação com o gel. Em adição, este capítulo estabeleceu, pela primeira vez, o avanço da análise do Reflectômetro Optipen em uma situação mais próxima da clínica (*in situ*) (PELÁ *et al.*, 2022 *in press*). Além disso, é importante relembrar que o segundo capítulo demonstrou uma alta comparação do perfil proteômico da PAE entre a condição *in situ* e *in vivo*, principalmente na expressão de proteínas ácido-resistentes (PELÁ *et al.*, 2020b). Levando isso em conta, nós acreditamos que estas duas condições *in situ* (dos capítulos 5 e 6) são altamente reprodutíveis para a condição *in vivo*.

Como destaque, o último capítulo trouxe a prova de conceito de todos os capítulos anteriores, por demonstrar que a CaneCPI-5 foi altamente eficiente em prevenir a erosão dentária inicial *in vivo*. O termo “prevenção” iniciou no capítulo anterior, devido a apenas uma aplicação do gel antes da formação da PAE (PELÁ *et al.*, 2022 *in press*), enquanto no quinto capítulo, a CaneCPI-5 foi aplicada quatro vezes ao dia (entre os desafios erosivos) (PELÁ *et al.*, 2021b). Também optamos pelo tratamento na forma de bochecho (por 1 min) por conta do bom êxito de proteção, demonstrado nos capítulos anteriores (PELÁ *et al.*, 2021a; PELÁ *et al.*, 2021b; PELÁ *et al.*, 2022), inclusive por ter demonstrado um melhor desempenho do que o tratamento com gel de quitosana. Além disso, é importante enfatizar que o Reflectômetro Optipen foi eficaz para avaliar a erosão dentária inicial *in vivo*, podendo-se validar esta análise

nos protocolos mais distantes da clínica, como por exemplo, *in vitro* (PELÁ *et al.*, 2021a). Em adição, neste capítulo utilizamos o Elmex[®] - Erosion Protection (disponível comercialmente), o qual é considerado “padrão ouro” para os estudos de erosão dentária. Nosso último resultado demonstrou que o enxaguatório com CaneCPI-5 foi tão eficaz quanto o Elmex[®]. Entretanto, como já mencionado, este produto comercial apresenta algumas desvantagens para utilização em longo prazo, podendo causar descoloração na superfície do esmalte (WEST *et al.*, 2012). Esta limitação pode ser considerada uma desvantagem quando comparada ao tratamento com a CaneCPI-5.

Por fim, a presente tese apresentou uma translação do uso da CaneCPI-5, partindo das ciências básicas para uma aplicação clínica, por meio dos procedimentos da engenharia de película adquirida contra a erosão dentária e o DDE. Além disso, esta tese demonstrou a eficácia de várias estratégias inovadoras envolvendo a aplicação da CaneCPI-5 sobre o esmalte dentário, como por exemplo, na forma de gota, enxaguatório ou gel, bem como o uso de diferentes combinações de tratamento (hemoglobina, peptídeo derivado da estaterina, fluoreto de sódio e gel de quitosana). Todas estas diferentes formas, foram fundamentais para abrir novos caminhos para o desenvolvimento de produtos odontológicos, os quais poderão estar disponíveis para a população a fim de se controlar e/ou prevenir o DDE. O próximo passo será realizar um estudo clínico de longo prazo para acompanhar o efeito preventivo da CaneCPI-5 na progressão do DDE.

11. CONCLUSÕES

11.1 Conclusões específicas

Esta tese apresentou sete capítulos experimentais, os quais foram desenvolvidos separadamente com as seguintes conclusões específicas:

Capítulo 1: Os resultados obtidos indicam que a nova técnica desenvolvida por meio da troca de saliva durante a formação da PAE foi essencial para uma maior identificação de proteínas deste integumento. Além disso, o ácido cítrico foi a melhor solução para coletar as proteínas da PAE para serem analisadas por espectrometria de massas.

Capítulo 2: Todos os perfis proteômicos (qualitativo e quantitativo) foram diferentes, principalmente no que diz respeito às proteínas típicas da PAE na condição *in vitro* quando comparada às condições *in situ* e *in vivo*.

Capítulo 3: O tratamento com a CaneCPI-5 demonstrou melhor efeito protetor diretamente na superfície do esmalte. Por outro lado, a Hemoglobina apresentou melhor resultado na engenharia de película adquirida. Diferentemente do peptídeo derivado da Estaterina, o qual não apresentou diferença entre as duas condições. Em adição, a combinação das três proteínas/peptídeo proporcionou o melhor efeito protetor para o esmalte nativo. O provável mecanismo de ação para esta combinação é por meio da adsorção das proteínas/peptídeo diretamente à superfície do esmalte, bem como por meio da engenharia de película adquirida.

Capítulo 4: A combinação entre a CaneCPI-5 (componente orgânico) e o NaF (componente inorgânico) demonstrou um efeito sinérgico, proporcionando uma melhor proteção contra a erosão dentária inicial *in vitro* por meio da engenharia de película adquirida.

Capítulo 5: A solução contendo CaneCPI-5 é segura e não promoveu alterações fenotípicas aos fibroblastos gengivais humanos. Além disso, a CaneCPI-5 protegeu o esmalte contra erosão e erosão+abrasão *in situ*.

Capítulo 6: O gel de quitosana contendo CaneCPI-5 foi capaz de prevenir a erosão e a erosão+abrasão no esmalte *in situ*.

Capítulo 7: O Reflectômetro Optipen foi uma excelente ferramenta para avaliar clinicamente os efeitos preventivos do bochecho com CaneCPI-5 por meio da engenharia de película adquirida contra a erosão dentária inicial.

11.2 Conclusão geral da tese

As novas estratégias do uso da CaneCPI-5 (em diferentes protocolos, combinações e veículos) por meio da engenharia de película adquirida demonstraram alta eficácia contra a erosão dentária inicial e o DDE. Por fim, esta tese apresentou importantes resultados para o *design* de futuros produtos odontológicos voltados para esta área de grande preocupação da saúde bucal.

REFERÊNCIAS

- ABLAL, M. A. *et al.* A novel approach to study in situ enamel erosion and abrasion lesions. **J Dent**, v. 59, p. 78-85, 2017.
- ADAN, A.; KIRAZ, Y.; BARAN, Y. Cell Proliferation and Cytotoxicity Assays. **Curr Pharm Biotechnol**, v. 17, n. 14, p. 1213-1221, 2016.
- ALENCAR, C. M. *et al.* Anti-erosive profile of an experimental 5% SnCl₂ varnish containing different concentrations of NaF. **Braz Dent J**, v. 33, n. 1, p. 68-76, 2022.
- ALENCAR, C. R. *et al.* Effect of different salivary exposure times on the rehardening of acid-softened enamel. **Braz Oral Res**, v. 30, e. 104, 2016.
- ALGARNI, A. A. *et al.* The impact of stannous, fluoride ions and its combination on enamel pellicle proteome and dental erosion prevention **PLoS One**, v. 10, n. 6, e. 0128196, 2015.
- AMBLARD, M. Fundamentals of modern peptide synthesis. **Methods Mol Biol**, v. 298, n. 3, p. 3-24, 2005.
- ARAUJO, T. T. *et al.* A sugarcane cystatin (CaneCPI-5) alters microcosm biofilm formation and reduces dental caries. **Biofouling**, v. 37, n. 1, p. 109-116, 2021.
- ARAÚJO, T. T. *et al.* Protein-based engineering of the initial acquired enamel pellicle in vivo: Proteomic evaluation. **J Dent**, v. 116, e. 103874, 2022.
- ARAÚJO, T. T. *et al.* Protein-based engineering of the initial acquired enamel pellicle in vivo: Proteomic evaluation. **J Dent**, v. 116, e. 103874, 2022.
- BABCOCK, F. D.; KING, J. C.; JORDAN, T. H. The reaction of stannous fluoride and hydroxyapatite. **J Dent Res**, v. 57, n. 9-10, p. 933-938, 1978.
- BAIG, A. A. *et al.* Protective effects of SnF₂ - Part I. Mineral solubilisation studies on powdered apatite. **Int Dent J**, v. 64, n. 1, p. 4-10, 2014.
- BARBOUR, M. E.; LUSSI, A. Erosion in relation to nutrition and the environment. **Monogr Oral Sci**, v. 25, p. 143-154, 2014.
- BARRETT, A. J. The cystatins: a diverse superfamily of cysteine peptidase inhibitors. **Biomed Biochim Acta**, v. 45, n. 11-12, p. 1363-1374, 1986.
- BARTLETT D. Intrinsic causes of erosion. **Monogr Oral Sci**, v. 20, p. 119-139, 2006.
- BARTLETT, D.; GANSS, C.; LUSSI, A. Basic Erosive Wear Examination (BEWE): a new scoring system for scientific and clinical needs. **Clin Oral Investig**, v. 12, n. 1, p. 65-68, 2008.
- BEKALE, L.; AGUDELO, D.; TAJMIR-RIAAHI, H. A. Effect of polymer molecular weight on chitosan-protein interaction. **J Colloid Interface Sci**, v. 125, p. 309-317, 2015.

BORYSENKO, A.; DUDNIKOVA, M. Clinical rationale of choosing a tooth-bleaching agent. **Georgian Med News**, v. 313, p. 48-51, 2021.

BREVIK, S. C.; LUSSI, A.; RAKHMATULLINA, E. A new optical detection method to assess the erosion inhibition by *in vitro* salivary pellicle layer. **J Dent**, v. 41, n. 5, p. 428-435, 2013.

BUZALAF, M. A. R. *et al.* Saliva as a diagnostic tool for dental caries, periodontal disease and cancer: is there a need for more biomarkers? **Expert Rev Mol Diagn**, v. 20, n. 5, p. 543-555, 2020.

BUZALAF, M. A. R.; MAGALHAES, A. C.; RIOS, D. Prevention of erosive tooth wear: targeting nutritional and patient-related risks factors. **Br Dent J**, v. 224, p. 371-378, 2018.

BUZALAF, M. A.; HANNAS, A. R.; KATO, M. T. Saliva and dental erosion. **J Appl Oral Sci**, v. 20, n. 5, p. 493-502, 2012a.

BUZALAF, M. A.; KATO, M. T.; HANNAS, A. R. The role of matrix metalloproteinases in dental erosion. **Adv Dent Res**, v. 24, n. 2, p. 72-76, 2012b.

CARPENTER, G. H. The secretion, components, and properties of saliva. **Annu Rev Food Sci Technol**, v. 4, p. 267-276, 2013.

CARVALHO, T. S. *et al.* Acquired pellicle protein-based engineering protects against erosive demineralization. **J Dent**, v. 102, e. 103478, 2020.

CARVALHO, T. S.; BAUMANN, T.; LUSSI, A. A new hand-held optical reflectometer to measure enamel erosion: correlation with surface hardness and calcium release. **Sci Rep**, v. 28, n. 6, 2016a.

CARVALHO, T. S.; BAUMANN, T.; LUSSI, A. Does erosion progress differently on teeth already presenting clinical signs of erosive tooth wear than on sound teeth? An *in vitro* pilot trial. **BMC Oral Health**, v. 17, n. 1, p. 1-14, 2016b.

CASSIANO, L. P. S. *et al.* Protein Profile of the Acquired Enamel Pellicle after Rinsing with Whole Milk, Fat-Free Milk, and Water: An *in vivo* Study, **Caries Res**, v. 52, n. 4, p. 288-296, 2018.

CHAN, K. H. *et al.* Methods for Monitoring Erosion Using Optical Coherence Tomography. **Proc SPIE Int Soc Opt Eng**, v. 25, 2013.

CHAN, W. C.; WHITE, P. D. Fmoc solid phase peptide synthesis: A practical approach. **Oxford University Press**, 2000.

CHAWHUAVEANG, D. D. *et al.* Acquired salivary pellicle and oral diseases: A literature review. **J Dent Sci**, v. 16, n. 1, p. 523-529, 2021.

CHEAIB, Z. *et al.* Impact of Acquired Pellicle Modification on Adhesion of Early Colonizers. **Caries Res**, v. 49, n. 6, p. 626-632, 2015.

CHEAIB, Z.; LUSSI, A. Impact of acquired enamel pellicle modification on initial dental erosion. **Caries Res**, v. 45, n. 2, p. 107-112, 2011.

CHU, L. J. *et al.* Variability Assessment of 90 Salivary Proteins in Intraday and Interday Samples from Healthy Donors by Multiple Reaction Monitoring-Mass Spectrometry. **Proteomics Clin Appl**, v. 12, e. 1700039, 2018.

CREETH, J. E. In situ efficacy of an experimental toothpaste on enamel rehardening and prevention of demineralisation: a randomised, controlled trial. **BMC Oral Health**, v. 20, p. 118, 2020.

DAWES, C.; JENKINS, G. N.; TONGUE, C. H. The nomenclature of the integuments of the enamel surface of the teeth. **Br Dent J**, v. 115, p. 65-68, 1963.

DE SOUZA, B. M. *et al.* Effect of an experimental mouth rinse containing NaF and TiF₄ on tooth erosion and abrasion in situ. **J Dent**, v. 73, p. 45-49, 2018.

DE SOUZA, E. S. C. M. *et al.* Effect of gels containing chlorhexidine or epigallocatechin-3-gallate on the protein composition of the acquired enamel pellicle. **Arch Oral Biol**, v. 82, p. 92-98, 2017.

DELECRODE, T. R. *et al.* Exposure to acids changes the proteomic of acquired dentine pellicle. **J Dent**, v. 43, n. 5, p. 583-588, 2015a.

DELECRODE, T. R. *et al.* Identification of acid-resistant proteins in acquired enamel pellicle. **J Dent**, v. 43, n. 12, p. 1470-1475, 2015b.

DELIUS, J. *et al.* Label-free quantitative proteome analysis of the surface-bound salivary pellicle. **Colloids Surf B Biointerfaces**, v. 152, p. 68-76, 2017.

DI GIORGI, N. *et al.* Salivary Proteomics Markers for Preclinical Sjögren's Syndrome: A Pilot Study. **Biomolecules**, v. 12, n. 6, p. 738, 2022.

DONOVAN, T. *et al.* Contemporary diagnosis and management of dental erosion. **J Esthet Restor Dent**. v. 33, n. 1, p. 78-87, 2021.

DUKIĆ, W. Erosive lesions in patients with alcoholism. **J Am Dent. Assoc**, v. 141, n. 12, p. 1452-1458, 2010.

EMEKLI-ALTURFAN, E. *et al.* Determination of storage time of saliva samples obtained from patients with and without chronic periodontitis for the comparison of some biochemical and cytological parameters. **J Clin Lab Anal**, v. 27, n. 4, p. 261-266, 2013.

FEATHERSTONE, J. D. B.; LUSSI, A. Understanding the chemistry of dental erosion. **Monogr Oral Sci**, v. 20, p. 66-76, 2006.

FERREIRA, S. S. *et al.* Supplementation of an orange juice with dietary proteins to prevent enamel and dentin erosion. **Braz Dent J**, v. 26, n. 3, p.263-267, 2015.

FLEMMING, J. *et al.* Preventive Applications of Polyphenols in Dentistry-A Review. **Int J Mol Sci**, v. 22, n. 9, e. 4892, 2021.

FRIED, W. A. *et al.* Imaging Early Demineralization on Tooth Occlusal Surfaces with a High Definition InGaAs Camera. **Proc SPIE Int Soc Opt Eng**, v. 25, 2013.

GANSS, C. *et al.* Efficacy of the stannous ion and a biopolymer in toothpastes on enamel erosion/abrasion. **J Dent**, v. 40, p. 1036-1043, 2012.

GANSS, C.; KLIMEK, J.; LUSSE, A. Accuracy and consistency of the visual diagnosis of exposed dentine on worn occlusal/incisal surfaces. **Caries Res**, v. 40, n. 3, p. 208-212, 2006.

GEURTSSEN, W. Biocompatibility of resin-modified filling materials. **Crit Rev Oral Biol Med**, v. 11, n. 3, p. 333-355, 2000.

HANNIG, M. Protective effect of the in situ formed short-term salivary pellicle. **Arch Oral Biol**, v. 49, n. 11, p. 903-910, 2004.

HANNIG, M.; BALZ, M. Influence of *in vivo* formed salivary pellicle on enamel erosion. **Caries Res**, v. 33, n. 5, p. 372-379, 1999.

HANNIG, M.; BALZ, M. Protective properties of salivary pellicles from two different intraoral sites on enamel erosion. **Caries Res**, v. 35, n. 2, p. 142-148, 2001.

HANNIG, M.; HANNIG, C. The pellicle and erosion. **Monogr Oral Sci**, v. 25, p. 206-214, 2014.

HANNIG, M.; JOINER, A. The structure, function and properties of the acquired pellicle. **Monogr Oral Sci**, v. 19, p. 29-64, 2006.

HARA, A. T. *et al.* Protective effect of the dental pellicle against erosive challenges *in situ*. **J Dent Res**, v. 85, n. 7, p. 612-616, 2006.

HARA, A. T.; ZERO, D. T. The caries environment: saliva, pellicle, diet, and hard tissue ultrastructure. **Dent Clin N Am**, v. 54, n. 3, p. 455-467, 2010.

HAWKINS, R. *et al.* Prevention. Part 7: professionally applied topical fluorides for caries prevention. **Br Dent J**, v. 195, p. 313-317, 2003.

HUMPHREY, S. P.; WILLIAMSON, R. T. A review of saliva: normal composition, flow, and function. **J Prosthet Dent**, v. 85, n. 2, p. 162-169, 2001.

HUYSMANS, M. C.; YOUNG, A.; GANSS, C. The role of fluoride in erosion therapy. **Monogr Oral Sci**, v. 25, p. 230-243, 2014.

IONTA, F. G. *et al.* Effect of in situ aspartame mouthwash to prevent intrinsic and extrinsic erosive tooth wear. **J Clin Exp Dent**, v. 12, n. 7, p. 638-643, 2020.

IONTA, F. Q. *et al.* Effect of palm oil alone or associated to stannous solution on enamel erosive-abrasive wear: A randomized in situ/ex vivo study. **Arch Oral Biol**, v. 95, p. 68-73, 2018.

IONTA, F. Q. *et al.* Effect of vegetable oils applied over acquired enamel pellicle on initial erosion. **Appl Oral Sci**, v. 25, n. 4, p. 420-426, 2017.

ISOLA G. Saliva biotechnology as a diagnostic tool for periodontal diseases: new challenges for clinical practice. **Front Biosci**, v. 14, n. 2, p. 9, 2022.

JAEGGI, T.; LUSSI, A. Prevalence, incidence and distribution of erosion. **Monogr Oral Sci**, v. 25, p. 55-73, 2014.

JAGER, D. H. J. *et al.* Effect of Salivary Factors on the Susceptibility of Hydroxyapatite to Early Erosion. **Caries Res**, v. 45, n. 6, p. 532-537, 2011.

JOHANSSON, A. K. *et al.* Eating disorders and oral health: a matched case-control study. **Eur J Oral Sci**, v. 120, n. 1, p. 61-68, 2012.

JORDÃO, C. M. *et al.* The Effect of Mucin in Artificial Saliva on Erosive Rehardening and Demineralization. **Caries Res**, v. 51, n. 2, p. 136-140, 2017.

JOSHI, M. *et al.* Techniques to Evaluate Dental Erosion: A Systematic Review of Literature. **J Clin Diagn Res**, v. 10, n. 10, p. 01-01, 2016.

KATO, M. T. *et al.* Gels containing MMP inhibitors prevent dental erosion in situ. **J Dent Res**, v. 89, p. 468-472, 2010.

KHURSHID, Z. *et al.* Role of Salivary Biomarkers in Oral Cancer Detection. **Adv Clin Chem**, v. 86, p. 23-70, 2018.

KIHARA, T. *et al.* Three-dimensional visualization analysis of in vitro cultured bone fabricated by rat marrow mesenchymal stem cells. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 316, n. 3, p. 943-948, 2004.

KONRADSSON, K. *et al.* Stabilized stannous fluoride dentifrice in relation to dental caries, dental erosion and dentin hypersensitivity: A systematic review. **Am J Dent**, v. 33, n. 2, p. 95-105, 2020.

KOSORIC, J. *et al.* A Synthetic Peptide Based on a Natural Salivary Protein Reduces Demineralisation in Model Systems for Dental Caries and Erosion. **Int J Pep Res Ther**, v. 13, n. 4, p. 497-503, 2007.

LAURANCE-YOUNG, P. *et al.* A review of the structure of human and bovine dental hard tissues and their physicochemical behaviour in relation to erosive challenge and remineralisation. **J Dent**, v. 39, n. 4, p. 266-272, 2011.

LEE, H. S. *et al.* Composto RJ Chitosan adsorption on hydroxyapatite and its role in preventing acid erosion. **J Colloid Interface Sci**, v. 385, n. 1, p. 235-243, 2012.

LEE, Y. H. *et al.* Proteomic evaluation of acquired enamel pellicle during *in vivo* formation. **PLoS One**, v. 8, n. 7, e. 67919, 2013.

LENDENMANN, U.; GROGAN, J.; OPPENHEIM, F. G. Saliva and dental pellicle--a review. **Adv Dent Res**, v. 14, p. 22-28, 2000.

LENNON, A. M. *et al.* Effect of a casein/calcium phosphate-containing tooth cream and fluoride on enamel erosion in vitro. **Caries Res**, v. 40, n. 2, p. 154-157, 2006.

LEVY, F. M. *et al.* Efficacy of TiF₄ and NaF varnish and solution: a randomized in situ study on enamel erosive-abrasive wear. **Clin Oral Investig**, v. 18, n. 4, p. 1097-1102, 2014.

LIN, A. *et al.* The impact of head and neck radiotherapy on salivary flow and quality of life: Results of the ORARAD study. **Oral Oncol**, v. 127, e. 105783, 2022.

LINS, R. B. E. *et al.* Does titanium tetrafluoride promote a protective effect on eroded tooth? A systematic review and meta-analysis. **J Evid Based Dent Pract**, v. 22, n. 1, e. 101682, 2022.

LIPEI, C.; XIANGKE, C.; XIAOYAN, O. Brushing abrasion of the enamel surface after erosion. **Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi**, v. 35, p. 379-383, 2017.

LIPPERT, F. An introduction to toothpaste - its purpose, history and ingredients. **Monogr Oral Sci**, v. 23, p. 1-14, 2013.

LITONJUA, L. A. *et al.* Toothbrushing and gingival recession. **Int Dent J**, v. 53, p. 67-72, 2003.

LONGRIDGE, N. N.; YOUNGSON, C. C. Dental Pain: Dentine Sensitivity, Hypersensitivity and Cracked Tooth Syndrome. **Prim Dent J**, v. 8, n. 1, p. 44-51, 2019.

LUSSI, A. *et al.* Dental erosion--an overview with emphasis on chemical and histopathological aspects. **Caries Res**, v. 45, p. 2-12, 2011.

LUSSI, A. *et al.* The use of fluoride for the prevention of dental erosion and erosive tooth wear in children and adolescents. **Eur Arch Paediatr Dent**, v. 20, n. 6, p. 517-527, 2019.

LUSSI, A. *et al.* Effects of enamel abrasion, salivary pellicle, and measurement angle on the optical assessment of dental erosion. **J Biomed Opt**, v. 17, n. 9, e. 97009, 2012.

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

MAENG, Y. *et al.* Diagnostic accuracy of a combination of salivary hemoglobin levels, self-report questionnaires, and age in periodontitis screening. **J Periodontal Implant Sci**, v. 46, n. 1, p. 10-21, 2016.

MARGIS, R.; REIS, E. M.; VILLERET, V. Structural and phylogenetic relationships among plant and animal cystatins. **Arch Biochem Biophys**, v. 359, n. 1 p. 24-30, 1998.

MARINHO, V. C. *et al.* Fluoride mouthrinses for preventing dental caries in children and adolescents. **Cochrane Database Syst Rev**, v. 7, 2016.

MARSH P. D. Dental plaque as a microbial biofilm. **Caries Res**, v. 38, p. 204-211, 2004.

MARTIGNON, S. *et al.* Epidemiology of Erosive Tooth Wear, Dental Fluorosis and Molar Incisor Hypomineralization in the American Continent. **Caries Res**, v. 55, n. 1, p. 1-11, 2021.

MARTINI, T. *et al.* Proteomics of acquired pellicle in gastroesophageal reflux disease patients with or without erosive tooth wear. **J Dent**, v. 81, p. 64-69, 2019.

MARTINI, T. *et al.* Salivary Hemoglobin Protects against Erosive Tooth Wear in Gastric Reflux Patients. **Caries Res**, p. 1-9, 2020.

MELETI, M. *et al.* Salivary biomarkers for diagnosis of systemic diseases and malignant tumors. A systematic review. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal**, v. 25, n. 2, p. 299-310, 2020.

MILOSEVIC, A. Abrasion: A Common Dental Problem Revisited. **Prim Dent J**, v. 6, n. 1, p. 32-36, 2017.

MOAZZEZ, R.; BARLETT, D. Intrinsic causes of erosion. **Monogr Oral Sci**, v. 25, p. 180-196, 2014.

MULLAN, F.; BARTLETT, D.; AUSTIN, R. S. Measurement uncertainty associated with chromatic confocal profilometry for 3D surface texture characterization of natural human enamel. **Dent Mater**, v. 33, n. 6, p. 273-281, 2017.

MUTAHAR, M. *et al.* Reduced statherin in acquired enamel pellicle on eroded teeth compared to healthy teeth in the same subjects: An in-vivo study. **PloS One**, v. 12, n. 8, e. 0183660, 2017.

NAHÓRNY, S.; DE OLIVEIRA, I. R.; SOARES, L. E. S. Biomineralization induced by chitosan and collagen-based materials with fluoride for dentin coverage: Chemical and morphological analysis. **Microsc Res Tech**, v. 85, n. 3, p. 1089-1100, 2022.

NEKRASHEVYCH, Y. *et al.* Influence of periodic milk or cream treatment on the anti-erosive potential of the acquired enamel pellicle. **J Dent**, v. 115, e. 103858, 2021.

NIEMEYER, S. H. *et al.* Salivary pellicle modification with polyphenol-rich teas and natural extracts to improve protection against dental erosion. **J Dent**, v. 105, e. 103567, 2021.

ODANAKA, H. *et al.* Comparison of protein profiles of the pellicle, gingival crevicular fluid, and saliva: possible origin of pellicle proteins. **Bio Res**, v. 1, p. 3, 2020.

OLIVEIRA, F. A. *et al.* Low intensity lasers differently induce primary human osteoblast proliferation and differentiation. **J Photochem Photobiol B**, v. 163, p. 14-21, 2016.

PEARCE, E. I.; BIBBY, B.G. Effects of time, surface area, pH and some ions on protein adsorption by bovine enamel. **Arch Oral Biol**, v. 11, n. 8, p. 825-832, 1966.

PEDERSEN, A. M. L. *et al.* Salivary secretion in health and disease. **J Oral Rehabil**, v. 45, n. 9, p. 730-746, 2018.

PEDERSEN, A. M. L.; BELSTRØM, D. The role of natural salivary defences in maintaining a healthy oral microbiota. **J Dent Res**, v. 80, p. 3-12, 2019.

VIEIRA-PEDROSA, B. R. V.; DE MENEZES, V. A. Prevalence of Erosive Tooth Wear and Related Risk Factors in Adolescents: An Integrative Review. **J Dent Child**, v. 87, p. 18-25, 2020.

PELÁ, V. T. *et al.* Acquired pellicle engineering with proteins/peptides: mechanism of action on native human enamel surface. **J Dent**, v. 107, e. 103612, 2021a.

PELÁ V. T. *et al.* Acquired Pellicle Engineering Using a Combination of Organic (Sugarcane Cystatin) and Inorganic (Sodium Fluoride) Components against Dental Erosion. **Caries Res**, v. 52, n. 2, p. 138-145, 2022.

PELÁ, V. T. *et al.* Antimicrobial and anti-caries effects of a novel cystatin from sugarcane on saliva-derived multi-species biofilms. **Swiss Dent J**, v. 131, n. 5, p. 410-416, 2021c.

PELÁ, V. T. *et al.* Preventive effect of chitosan gel containing CaneCPI-5 against enamel erosive wear in situ. **Clin Oral Investig**, 2022, *in press*.

PELÁ, V. T. *et al.* Proteomic analysis of the acquired enamel pellicle formed on human and bovine tooth: a study using the Bauru in situ pellicle model (BISPM). **J Appl Oral Sci**, v. 27, e. 20180113, 2018.

PELÁ, V. T. *et al.* Safety and In Situ Antierosive Effect of CaneCPI-5 on Dental Enamel. **J Dent Res**, v. 100, p. 1344-1350, 2021b.

PELÁ, V. T. *et al.* The influence of fillers and protease inhibitors in experimental resins in the protein profile of the acquired pellicle formed in situ on enamel-resin specimens. **Arch Oral Biol**, v. 108, p. 104527, 2019.

PELÁ, V. T.; VENTURA, T. M. O.; BUZALAF, M. A. R. Optimizing the formation of the acquired enamel pellicle in vitro for proteomic analysis. **J Appl Oral Sci**, v. 28, e. 20200189, 2020a.

PELÁ, V.T. *et al.* Proteomic profiles of the acquired enamel pellicle formed in vitro, in situ, or in vivo. **Eur J Oral Sci**, v. 128, n. 6, p. 487-494, 2020b.

PICOS A. *et al.* Factors associated with dental erosions in gastroesophageal reflux disease: a cross-sectional study in patients with heartburn. **Med Pharm Rep**, v. 93, n. 1, p. 23-29, 2020.

RAJ, P. A. *et al.* Salivary statherin. Dependence on sequence, charge, hydrogen bonding potency, and helical conformation for adsorption to hydroxyapatite and inhibition of mineralization. **J Biol Chem**, v. 267, n. 9, 5968-5976, 1992.

RAKHMATULLINA, E. *et al.* Optical pensize reflectometer for monitoring of early dental erosion in native and polished enamels. **J Biomed Opt**, v. 18, n. 11, e. 117009, 2013.

RASPUTNIS, W.; SCHESTAKOW, A.; HANNIG, M. The dentin pellicle - A neglected topic in dental research. **Arch. Oral Biol**, v. 129, e. 105212, 2021.

REHAGE, M. *et al.* Oral astringent stimuli alter the enamel pellicle's ultrastructure as revealed by electron microscopy. **J Dent**, v. 63, p. 21-29, 2017.

RIOS, D. *et al.* Vitamin E: A potential preventive approach against dental erosion-an in vitro short-term erosive study. **J Dent**, v. 113, e. 103781, 2021.

RISON, S. C.; HODGMAN, T. C.; THORNTON, J. M. Comparison of functional annotation schemes for genomes. **Funct Integr Genomics**, v. 1, n. 1, p. 56-69, 2000.

SAADS CARVALHO, T.; LUSSI, A. Chapter 9: Acidic Beverages and Foods Associated with Dental Erosion and Erosive Tooth Wear. **Monogr Oral Sci**, v. 28, p. 91-98, 2020.

SAHEBJAMEE, M. *et al.* Human papillomavirus in saliva of patients with oral squamous cell carcinoma. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal**, v. 14, n. 10, p. 525-528, 2009.

SALAS, M. M. S. *et al.* Estimated prevalence of erosive tooth wear in permanent teeth of children and adolescents: An epidemiological systematic review and meta-regression analysis. **J Dent**, v. 43, n. 1, p. 42-50, 2015.

SALEM, M. N.; HAFEZ, S. Aesthetic Management of Erosive Tooth Wear in a Young Egyptian Swimmer: A Case Report. **Clin. Cosmet Investig Dent**, v. 13, p. 201-209, 2021.

SANTIAGO, A. C. *et al.* A New Sugarcane Cystatin Strongly Binds to Dental Enamel and Reduces Erosion. **J Dent Res**, v. 96, p. 1051-1057, 2017.

SANTOS, L. A. *et al.* Solutions and Gels Containing a Sugarcane-Derived Cystatin (CaneCPI-5) Reduce Enamel and Dentin Erosion in vitro. **Caries Res**, v. 55, n. 6, p. 594-602, 2021.

SANTOS, O. Adsorption behavior of statherin and a statherin peptide onto hydroxyapatite and silica surfaces by in situ ellipsometry. **J. Colloid Interface Sci**, v. 318, n. 2, p. 175-182, 2008.

SARIALIOGLU, G. A.; DONMEZ, N. Dentin erosion preventive effects of various plant extracts: An in vitro atomic force microscopy, scanning electron microscopy, and nanoindentation study. **Microsc Res Tech**, v. 84, n. 5, p. 1042-1052, 2021.

SCHLUETER, N. *et al.* Methods for the measurement and characterization of erosion in enamel and dentine. **Caries Res**, v. 45, p. 13-23, 2011.

SCHLUETER, N. *et al.* Terminology of Erosive Tooth Wear: Consensus Report of a Workshop Organized by the ORCA and the Cariology Research Group of the IADR. **Caries Res**, v. 54, n. 1, p. 2-6, 2020.

SCHLUETER, N.; KLIMEK, J.; GANSS, C. Effect of stannous and fluoride concentration in a mouth rinse on erosive tissue loss in enamel in vitro. **Arch Oral Biol**, v. 54, n. 5, p. 432-436, 2009a.

SCHLUETER, N.; KLIMEK, J.; GANSS, C. In vitro efficacy of experimental tin- and fluoride-containing mouth rinses as anti-erosive agents in enamel. **J Dent**, v.37, n. 12, p. 944-948, 2009b.

SHAH, S. *et al.* An *in vitro* scanning microradiography study of the reduction in hydroxyapatite demineralization rate by statherin-like peptides as a function of increasing N-terminal length. **Eur. J. Oral Sci**, v. 119, p. 13-18, 2011.

SHELLIS, R. P. *et al.* Methodology and models in erosion research: discussion and conclusions. **Caries Res**, v. 45, p. 69-77, 2011.

SHELLIS, R. P.; ADDY, M. The interactions between attrition, abrasion and erosion in tooth wear. **Monogr Oral Sci**, v. 25, p. 32-45, 2014.

SHIBAO, P. Y. T. *et al.* Sugarcane cystatins: From discovery to biotechnological applications. **Int J Biol Macromol**, v. 167, p. 676-686, 2021.

SI, L. L. *et al.* Establishment and identification of human primary lung cancer cell culture *in vitro*. **Int J Clin Exp Path**, v. 8, n. 6, p. 6540-6546, 2015.

SILVA, E. J.; SANTOS, C. C.; ZAIA, A. A. Long-term cytotoxic effects of contemporary root canal sealers. **J Appl Oral Sci**, v. 21, n. 1, p. 43-47, 2013.

SILVEIRA, C. *et al.* Anacardic acid from brazilian cashew nut trees reduces dentine erosion. **Caries Res**, v. 48, n. 6, p. 549-556, 2014.

SINGH, T. P.; NIROLA, A.; BRAR, R. A profilometric and scanning electron microscopic analysis of tooth surface abrasion caused by rotary/oscillatory, linear motion, sonic, and ultrasonic toothbrushes: An *in vitro* study. **J Indian Soc Periodontol**, v. 25, n. 2, p. 112-119, 2021.

SIQUEIRA, W. L. *et al.* Identification of protein components in *in vivo* human acquired enamel pellicle using LC-ESI-MS/MS. **J Proteome Res**, v. 6, n. 6, p. 2152-2160, 2007.

SIQUEIRA, W. L. *et al.* Quantitative proteomic analysis of the effect of fluoride on the acquired enamel pellicle. **PloS one**, v. 7, e. 42204, 2012b.

SIQUEIRA, W. L.; CUSTODIO, W.; MCDONALD, E. E. New Insights into the Composition and Functions of the Acquired Enamel Pellicle. **J. Dent. Res**, v. 91, n. 12, p. 1110-1118, 2012.

SMITS, K. P. J.; LISTL, S.; JEVDJEVIC, M. Vegetarian diet and its possible influence on dental health: A systematic literature review. **Community Dent Oral Epidemiol**, v. 48, n. 1, p. 7-13, 2020.

SOARES-COSTA, A. *et al.* sugarcane cystatin: recombinant expression, purification, and antifungal activity. **Biochem. Biophys. Res. Commun**, v. 296, n. 5, p. 1194-1199, 2002.

SONG, G. *et al.* Evaluation of the Safety, Cell Migration, and Mucoadhesive Properties of a Mucoadhesive Polymer Blend in Human Oral Mucosa. **AAPS PharmSciTech**, v. 18, n. 5, p. 1617-1623, 2017.

STOOKEY, G. K. Optical methods--quantitative light fluorescence. **J Dent Res**, v. 83, p. 84-88, 2004.

TAIRA, E. A. *et al.* Changes in the Proteomic Profile of Acquired Enamel Pellicles as a Function of Their Time of Formation and Hydrochloric Acid Exposure, **Caries Res**, v. 52, n. 5, p. 367-377, 2018.

TAIRA, E. A. *et al.* Statherin-derived peptide protects against intrinsic erosion. **Arch Oral Biol**, v. 119, e. 104890, 2020.

TEN CATE, J. M.; BUZALAF, M. A. R. Fluoride Mode of Action: Once There Was an Observant Dentist. **J Dent Res**, v. 98, n. 7, p. 725-730, 2019.

TRAUTMANN, S. *et al.* Deep Proteomic Insights into the Individual Short-Term Pellicle Formation on Enamel-An In Situ Pilot Study. **Proteomics Clin Appl**, v. 14, n. 3, e. 1900090, 2020.

TSAI, M. T. Early detection of enamel demineralization by optical coherence tomography. **Sci Rep**, v. 9, n. 1, e. 17154, 2019.

VAN, N. A. A; BOLSCHER, J. G.; VEERMAN, E. C. Salivary proteins: protective and diagnostic value in cariology? **Caries Res**, v. 38, n. 3, p. 247-253, 2004.

VENTURA, T. M. *et al.* The proteomic profile of the acquired enamel pellicle according to its location in the dental arches. **Arch Oral Biol**, v. 79, p. 20-29, 2007.

VICENTE, A. *et al.* Effectiveness of a toothpaste and a serum containing calcium silicate on protecting the enamel after interproximal reduction against demineralization. **Sci Rep**, v. 11, p. 834, 2021.

VIJAY, A. *et al.* Factors That Influence the Extensional Rheological Property of Saliva. **PLoS One**, v. 10, n. 8, e. 0135792, 2015.

VOGEL, G. L. *et al.* "Effect of a calcium prerinse on salivary fluoride after a 228-ppm fluoride rinse." **Caries Res**, v. 40, n. 2, p. 178-180, 2006.

VORONETS, J.; LUSSI, A. Thickness of softened human enamel removed by toothbrush abrasion: an in vitro study. **Clin Oral Investig**, v. 14, p. 251-256, 2010.

VUKOSAVLJEVIC, D. *et al.* Acquired pellicle as a modulator for dental erosion. **Arch Oral Biol**, v. 59, n. 6, p. 631-638, 2014.

WACHTEL, L. W. In Vitro Comparison of Effects of Topical Stannic Fluoride and Stannous Fluoride Solutions on Enamel Solubility. **Arch Oral Biol**, v. 9, p. 439-445, 1964.

WANG, X.; LUSSI, A. Assessment and management of dental erosion. **Dent Clin North Am**, v. 54, n. 3, p. 565-578, 2010.

WEBER, M. T. *et al.* Application of Plant Extracts for the Prevention of Dental Erosion: An in situ/in vitro Study. **Caries Res**, v. 49, n. 5, p. 477-487, 2015.

WEST, X. *et al.* A randomised crossover trial to compare the potential of stannous fluoride and essential oil mouth rinses to induce tooth and tongue staining. **Clin Oral Investig**, v. 16, n. 3, p. 821-826, 2012.

WIEGAND, A; ATTIN, T. Design of erosion/abrasion studies--insights and rational concepts. **Caries Res**, v. 45, n. 1, p. 53-59, 2011.

WU, J.; FRIED, D. High contrast near-infrared polarized reflectance images of demineralization on tooth buccal and occlusal surfaces at $\lambda=1310\text{-nm}$. **Lasers Surg Med**, v. 41, n. 3, p. 208-213, 2009.

YE, X. Y. *et al.* Effects of casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate on enamel erosion: an *in situ* study. **Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi**, v. 53, n. 3, p. 195-200, 2018.

YIP, K.; LAM, P. P.Y.; YIU, C. K. Y. Prevalence and Associated Factors of Erosive Tooth Wear among Preschool Children-A Systematic Review and Meta-Analysis. **Healthcare (Basel)**, v. 7, n. 3, p. 491, 2022.

YU, Y. D. *et al.* Hydroxyapatite nanorod-assembled porous hollow polyhedra as drug/protein carriers. **J. Colloid Interface Sci**, v. 496, p. 416-424, 2017.

ZANATTA, R. F. *et al.* Protective effect of fluorides on erosion and erosion/abrasion in enamel: a systematic review and meta-analysis of randomized *in situ* trials. **Arch Oral Biol**, v. 120, e. 104945, 2020.

ZIMMERMAN, J. N. *et al.* Proteome and peptidome of human acquired enamel pellicle on deciduous teeth. **Int J Mol Sci**, v. 14, n. 1, p. 920-934, 2013.

ZIMMERMANN, R. *et al.* Impact of oral astringent stimuli on surface charge and morphology of the protein-rich pellicle at the tooth-saliva interphase. **Colloids Surf B**, v. 174, p. 451-458, 2019.

APÊNDICE 1

Optimizing the formation of the acquired enamel pellicle *in vitro* for proteomic analysis

Abstract

Vinícius Taioqui PELÁ¹ 
Talita Mendes Oliveira VENTURA² 
Marília Afonso Rabelo BUZALAF² 

Saliva is the major contributor for the protein composition of the acquired enamel pellicle (AEP), a bacteria-free organic layer formed by the selective adsorption of salivary proteins on the surface of the enamel. However, the amount of proteins that can be recovered is even smaller under *in vitro* condition, due to the absence of continuous salivary flow. Objective: This study developed an *in vitro* AEP protocol for proteomics analysis using a new formation technique with different collection solutions. Methodology: 432 bovine enamel specimens were prepared (4x4 mm) and divided into four groups (n=108). Unstimulated saliva was provided by nine subjects. The new AEP formation technique was based on saliva resupply by a new one every 30 min within 120 minutes at 37°C under agitation. AEP was collected using an electrode filter paper soaked in the collection solutions according with the group: 1) 3% citric acid (CA); 2) 0.5% sodium dodecyl sulfate (SDS); 3) CA followed by SDS (CA+SDS); 4) SDS followed by CA (SDS+CA). The pellicles collected were processed for analysis through LC-ESI-MS/MS technique. Results: A total of 55 proteins were identified. The total numbers of proteins identified in each group were 40, 21, 28 and 41 for the groups CA, SDS, CA+SDS and SDS+CA, respectively. Twenty-three typical AEP proteins were identified in all groups, but *Mucin* was only found in CA and CA+SDS, while three types of PRP were not found in the SDS group. Moreover, a typical enamel protein, *Enamelin*, was identified in the CA+SDS group only. Conclusion: The new technique of the *in vitro* AEP formation through saliva replacement was essential for a higher number of the proteins identified. In addition, considering practicality, quantity and quality of identified proteins, citric acid seems to be the best solution to be used for collection of AEP proteins.

Keywords: Pellicle. Enamel. Saliva. Proteomics. Methods.

Submitted: March 24, 2020
Modification: May 14, 2020
Accepted: June 18, 2020

Corresponding address:
Marília Afonso Rabelo Buzalaf
Universidade de São Paulo -
Faculdade de Odontologia de Bauru -
Departamento de Ciências Biológicas.
Av. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 -
17012-901 - Bauru - SP - Brasil.
Phone: 55-14-32358346 - Fax: 55-14-32271486 -
e-mail: mbuzalaf@fob.usp.br

¹Universidade Federal de São Carlos, Departamento de Genética e Evolução, São Carlos, SP, Brasil.
²Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia de Bauru, Departamento de Ciências Biológicas, Bauru, SP, Brasil.



Proteomic profiles of the acquired enamel pellicle formed in vitro, in situ, or in vivo

Pelá VT, Lunardelli JGQ, Ventura TMO, Camiloti GD, Baumann T, Carvalho TS, Lussi A, Buzalaf MAR. Proteomic profiles of the acquired enamel pellicle formed in vitro, in situ, or in vivo.

Eur J Oral Sci. 2020; 00: 1–8. © 2020 Eur J Oral Sci

This study compared the protein profile of the acquired enamel pellicle (AEP) formed under three conditions: in vitro, in situ, and in vivo. Nine volunteers participated in all procedures. In the in vitro condition, the volunteers donated saliva, in which specimens were incubated to form the AEP. In the in situ condition, the volunteers used an oral device containing specimens where the AEP was formed. In the in vivo condition, the AEP was collected from the volunteers own teeth. All AEPs were formed for 120 min, collected and processed by mass spectrometry. Overall, a total of 321 proteins were identified, among which 37 proteins are commonly considered typical in the AEP. For each of the in vitro, in situ, and in vivo conditions, respectively, 66, 174, and 170 proteins were identified. For the in vitro condition, 17 pellicle-typical proteins were not identified. Furthermore, several proteins with important functions within the AEP presented differences in expression in the three conditions. The qualitative profile of the proteins, especially the typical ones, is different in the in vitro condition. In addition, there are important quantitative differences that may interfere when attempting to extrapolate in vitro results to an in situ and in vivo condition.

Vinicius T. Pelá¹, João G.Q. Lunardelli², Talita M.O. Ventura², Gabriel D. Camiloti², Tommy Baumann³, Thiago S. Carvalho³ , Adrian Lussi³, Marília A.R. Buzalaf² 

¹Department of Genetics and Evolution, Federal University of São Carlos, São Carlos; ²Department of Biological Sciences, Bauru School of Dentistry, University of São Paulo, Bauru-SP, Brazil; ³Department of Restorative, Preventive and Pediatric Dentistry, School of Dental Medicine, University of Bern, Bern, Switzerland

Marília Afonso Rabelo Buzalaf, Department of Biological Sciences, Bauru School of Dentistry, University of São Paulo. Al. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 Bauru-SP, 17012-901 Brazil

E-mail: mbuzalaf@fob.usp.br

Key words: mass spectrometry; proteomics; saliva

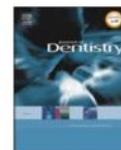
Accepted for publication October 2020

The acquired enamel pellicle (AEP) is a bacteria-free layer composed chiefly of saliva-derived proteins and glycoproteins that adsorb to the dental surface, with carbohydrates, neutral lipids, phospholipids, and glycolipids also contained in minor amounts (1-4). The AEP executes important functions, such as acting as a diffusion barrier, decreasing the direct contact of acids with the tooth surface, and protecting against dissolution (5-7). The effectiveness of this protection depends on the AEP composition and physical properties (5,8,9). It is generally accepted that the AEP is composed of a tightly bound basal layer, with proteins strongly adhered to the tooth surface, and a more loosely packet globular layer, formed mostly by protein-protein interactions.

In an attempt to further understand which proteins are present in the AEP and their role in protecting against acid dissolution, proteomic tools have been widely employed in the last decade to evaluate protein profiles. To date, more than 300 proteins have been identified in the AEP (10), considering both the basal and globular layer. However, one of the main limiting factors of proteomic analysis is undoubtedly the tiny amount of proteins that can be recovered from a single dental surface. Therefore, in most in vivo studies proteins are collected from different tooth surfaces across a whole dental arch. This, on the one hand, allows for the recovery of larger amounts of proteins to be

analyzed (11-13), but on the other hand, the composition of the AEP changes according to its location in the dental arches (10). In this regard, some in situ studies have also been performed (14-17), in which the AEP has been collected only from some tooth specimens that can be precisely placed at defined locations within the volunteer's mouth, thus lowering the variations arising from location in the dental arches. Though in situ conditions can decrease AEP variations, these studies are more difficult to conduct because they require specialized preparation of dental specimens as well as a team of volunteers who are willing to wear oral appliances for longer periods. As the latter can be problematic to arrange, in in vitro experiments the AEP can be formed in the laboratory from saliva donated by the volunteers. Though these in vitro conditions are easier to perform, they can still be challenging, because the AEP formed in the laboratory does not mimic the normal salivary flow observed under in situ and in vivo conditions. Moreover, the number of proteins obtained from in vitro formed AEP is very limited, and this is highlighted by two studies published so far (to the best of our knowledge) analyzing the proteomic composition formed under these conditions, where the authors identified 45 and 55 proteins, respectively (18,19).

The usefulness of in vitro and in situ conditions to analyze proteomic profiles of AEP can, therefore, be questioned, especially because in vivo conditions



Acquired pellicle engineering with proteins/peptides: Mechanism of action on native human enamel surface

Vinícius Taioqui Pelá^{a,c}, Marília Afonso Rabelo Buzalaf^{b,*}, Samira Helena Niemeyer^c, Tommy Baumann^c, Flávio Henrique-Silva^a, Danyelle Toyama^a, Edson Crusca^d, Reinaldo Marchetto^d, Adrian Lussi^c, Thiago Saads Carvalho^c

^a Department of Genetics and Evolution, Federal University of São Carlos, São Carlos, SP, Brazil

^b Department of Biological Sciences, Bauru School of Dentistry, University of São Paulo, Bauru, SP, Brazil

^c Department of Restorative, Preventive and Pediatric Dentistry, School of Dental Medicine, University of Bern, BE, Switzerland

^d Chemistry Institute, Paulista State University, Araraquara, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
Acquired pellicle
Dental erosion
Enamel
Protein
Pellicle modification
saliva

ABSTRACT

Objective: This study investigated the mechanism of action of different proteins/peptides (separately or in combination), focusing on how they act directly on the native enamel surface and on modifying the salivary pellicle.

Methods: A total of 170 native human enamel specimens were prepared and submitted to different treatments (2 h; 37 °C): with deionized water, CaneCPI-5, Hemoglobin, Statherin, or a combination of all three proteins/peptides. The groups were subdivided into treatment acting on the enamel surface (NoP – absence of salivary pellicle), and treatment modifying the salivary pellicle (P). Treatment was made (2 h; 37 °C) in all specimens, and later, for P, the specimens were incubated in human saliva (2 h; 37 °C). In both cases, the specimens were immersed in 1% citric acid (pH 3.6; 2 min; 25 °C). Calcium released from enamel (CaR) and its relative surface reflection intensity (%SRI) was measured after 5 cycles. Between-group differences were verified with two-way ANOVA, with “presence of pellicle” and “treatment” as factors ($\alpha = 0.05$).

Results: The presence of pellicle provided better protection regarding %SRI ($p < 0.01$), but not regarding CaR ($p = 0.201$). In relation to treatment, when compared to the control group, all proteins/peptides provided significantly better protection ($p < 0.01$ for %SRI and CaR). The combination of all three proteins/peptides demonstrated the best protective effect ($p < 0.01$ for %SRI). Conclusion: Depending on the protein or peptide, its erosion-inhibiting effect derives from their interaction with the enamel surface or from modifying the pellicle, so a combination of proteins and peptides provides the best protection.

Clinical significance: The present study opens a new direction for a possible treatment with a combination of proteins for native human enamel, which can act directly on the enamel surface as well on the modification of the salivary pellicle, for the prevention of dental erosion.

1. Introduction

The continuous interaction of dental surfaces with chemical (acid) challenges causes a cumulative loss of dental hard tissue. This process is known as dental erosion [1]. The causative acids can originate from the diet (extrinsic) [2] or from the gastric content of the host (intrinsic) [3].

Several patient-related factors are linked to dental erosion, such as biological, nutritional and behavioral factors [4].

Among the biological factors, saliva is considered as one of the most important, constituting a protective role due to its numerous functions [5–8]. It dilutes and buffers the acids and provides ions for remineralization. Furthermore, the presence of saliva in the oral cavity may

* Corresponding author. Present address: Department of Biological Sciences, Bauru School of Dentistry, University of São Paulo, SP, Al. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75, Bauru, SP, 17012-901, Brazil.

E-mail addresses: vinicius.asb@hotmail.com (V.T. Pelá), mbuzalaf@fob.usp.br (M.A.R. Buzalaf), samira.niemeyer@zmk.unibe.ch (S.H. Niemeyer), tommy.baumann@zmk.unibe.ch (T. Baumann), dflhs@ufscar.br (F. Henrique-Silva), danyebio@yahoo.com.br (D. Toyama), ecrusca@gmail.com (E. Crusca), reinaldo.marchetto@unesp.br (R. Marchetto), adrian.lussi@zmk.unibe.ch (A. Lussi), thiago.saads@zmk.unibe.ch (T.S. Carvalho).

<https://doi.org/10.1016/j.jdent.2021.103612>

Received 16 November 2020; Received in revised form 11 February 2021; Accepted 17 February 2021

Available online 20 February 2021

0300-5712/© 2021 Elsevier Ltd. All rights reserved.

APÊNDICE 4

Caries
Research

Research Article

Caries Res 2022;56:138–145
DOI: 10.1159/000522490Received: June 9, 2021
Accepted: February 6, 2022
Published online: February 15, 2022**Acquired Pellicle Engineering Using a Combination of Organic (Sugarcane Cystatin) and Inorganic (Sodium Fluoride) Components against Dental Erosion**Vinícius Taioqui Pelá^{a,b} Samira Helena Niemeyer^b Tommy Baumann^b
Flávia Mauad Levy^c Flávio Henrique-Silva^a Adrian Lussi^b
Thiago Saads Carvalho^b Marília Afonso Rabelo Buzalaf^c^aDepartment of Genetics and Evolution, Federal University of São Carlos, São Carlos, Brazil; ^bDepartment of Restorative, Preventive and Pediatric Dentistry, School of Dental Medicine, University of Bern, Bern, Switzerland; ^cDepartment of Biological Sciences, Bauru School of Dentistry, University of São Paulo, Bauru, Brazil**Keywords**

Enamel · Protein · Saliva · Fluoride

Abstract

This study evaluated the combination of a sugarcane cystatin (CaneCPI-5) and sodium fluoride (NaF) in acquired pellicle engineering for the prevention of dental erosion *in vitro*. Seventy-five human enamel specimens were prepared and divided into 5 treatment groups ($n = 15/\text{group}$): Deionized water (Control); Elmex™ (SnCl₂/NaF/AmF); 0.1 mg/mL CaneCPI-5; 500 ppm NaF; and CaneCPI-5+NaF (Combination). The specimens were individually treated (200 µL; 2 min; 37°C), then incubated in human saliva (200 µL; 1 h, at 37°C) for acquired pellicle formation. Afterward, the specimens were submitted to an erosive challenge (1% citric acid [CR], pH 3.6, 10 mL, 2 min, 25 °C). This sequence was conducted 5 times. Percentage of surface microhardness change (%SMC), relative surface reflection intensity (rSRI), and calcium released to the CR were measured and analyzed by one-way ANOVA followed by Tukey's test ($p < 0.05$). In general, all the treatments (SnCl₂/NaF/AmF, CaneCPI-5, NaF, and Combination) significantly protected the enamel when compared the control group. Regarding %SMC and rSRI, the Combination was

the most effective treatment, reducing the %SMC significantly ($p < 0.01$) when compared to all the other treatments, although this difference was not significant in the CR analysis. All treatments demonstrated a protective effect on enamel against dental erosion; however, the combination of CaneCPI-5 with NaF showed a greater protection.

© 2022 S. Karger AG, Basel

Introduction

Nonbacterial acids on the tooth surface promote the dissolution and loss of the mineral substrate, leaving the demineralized surface more liable to mechanical impacts and wear; this action is defined as dental erosion [Schluter et al., 2020]. Despite the lack of comprehensive data on the prevalence of this type of wear, a recent study showed that this condition is widely common due to its multifactorial etiology and the increase in its severity with age [Martignon et al., 2021]. Saliva is considered an important biological factor against dental erosion through the supply of calcium, phosphate, and fluoride ions that contribute to tooth remineralization. Moreover, the organic components of saliva, especially proteins, lead to

Karger@karger.com
www.karger.com/cre

© 2022 S. Karger AG, Basel

Karger

Correspondence to:
Marília Afonso Rabelo Buzalaf, mbuzalaf@fob.usp.br

APÊNDICE 5



Research Reports: Clinical

Safety and In Situ Antierosive Effect of CaneCPI-5 on Dental Enamel

Journal of Dental Research
1–7
© International & American Associations
for Dental Research 2021
Article reuse guidelines:
sagepub.com/journals-permissions
DOI: 10.1177/00220345211011590
journals.sagepub.com/home/jdr

V.T. Pelá¹, J.G.Q. Lunardelli², C.K. Tokuhara², C.C. Gironda²,
N.D.G. Silva², T.S. Carvalho², A.C. Santiago¹, B.M. Souza²,
S.M. Moraes², F. Henrique-Silva¹, A.C. Magalhães², R.C. Oliveira²,
and M.A.R. Buzalaf²

Abstract

The sugarcane cystatin (CaneCPI-5) was recently cloned and showed strong binding force to dental enamel and protection against initial erosion. However, evaluations on its safety and efficacy in a situation closer to the clinical condition are necessary. In the present study we analyzed 1) the cytotoxicity of CaneCPI-5 on human gingival fibroblasts (HGFs); 2) the ability of CaneCPI-5 to reduce enamel erosion and erosion+abrasion in situ. In part 1, HGFs were treated with CaneCPI-5 (0.025, 0.05, 0.1, 0.5 or 1.0 mg/mL) or no treatment (control). The cytotoxicity was assessed after 60 s and 24 h by mitochondrial activity (MTT), confocal microscopy, and hematoxylin/eosin staining. In part 2, 15 volunteers participated in a double-blind crossover protocol consisting of 3 phases, according to the following treatments: 1) 0.1 mg/mL CaneCPI-5; 2) SnCl₂/NaF/AmF (Elmex; positive control); 3) water (negative control). The volunteers wore an appliance containing 4 bovine enamel specimens for 5 d. Each day, the specimens were individually treated with 50 µL of the tested solutions per 60 s and then subjected to erosive challenges (0.1% citric acid, pH 2.5, for 90 s, 4 times per day). After the first and last erosive challenge each day, 2 samples were abraded (toothbrushing, 15 s). Enamel wear was measured by contact profilometry. One or two-way analysis of variance (ANOVA)/Tukey's or Sidak's tests ($P < 0.05$) were applied. Regardless of the concentration and the experimental time, CaneCPI-5 did not decrease the cell viability compared to the negative control ($P < 0.05$). Erosion+abrasion led to significantly greater wear compared to erosion only. For both conditions, the lowest wear was found for SnCl₂ and CaneCPI-5, which did not differ significantly from each other, but showed significant protection when compared to the negative control. In conclusion, CaneCPI-5 is safe on HGFs and reduces enamel erosive wear to the same extent as a commercial solution used to control erosive tooth wear (ETW).

Keywords: erosion, fibroblast, prevention, saliva, tooth wear, cystatins

Introduction

The estimated prevalence of erosive tooth wear (ETW) among children and adolescents is around 30% (Salas et al. 2015). Considering the progressive nature of the condition, measures to prevent and/or intercept it are necessary. Most of the dental products developed so far include inorganic components, especially fluorides (Huysmans et al. 2014), with only a few focusing on organic compounds (Buzalaf et al. 2014, 2015). In view of this gap in the literature, our group turned its attention to finding acid-resistant proteins in the acquired enamel pellicle (AEP). Employing proteomic tools, we identified cystatin-B as an acid-resistant protein in the AEP (Delecrode et al. 2015). Later, in view of the economic and technological relevance for inclusion of this type of protein in dental products, we cloned and recombinantly expressed a sugarcane-derived cystatin, named CaneCPI-5 (Santiago et al. 2017).

Cystatins are cysteine protease inhibitors present in almost all organisms that have been extensively studied in the last decades (for review see Barrett 1986; Turk and Bode 1991; Benchabane et al. 2010; Shibao et al. 2020). As competitive inhibitors, they interact with the active-site cleft of the target

cysteine peptidases by three-point interaction between the inhibitor and the enzyme (Turk and Bode 1991; Margis et al. 1998). In plants, cystatins are classified in a special family, called phytocystatins (Margis et al. 1998), wherein CaneCPI-5 is included. This innovative protein demonstrated several advantageous features, among them a strong binding force to hydroxyapatite and inhibition of initial enamel erosion in vitro (Santiago et al. 2017). Furthermore, in an in vivo proof-of-concept study, rinsing with CaneCPI-5 before the formation of the AEP increased several acid-resistant proteins in the AEP (Carvalho et al. 2020). In order for the concept of AEP engineering with this protein to be broadly employed to prevent

¹Department of Genetics and Evolution, São Carlos Federal University, São Carlos, São Paulo, Brazil

²Department of Biological Sciences, Bauru School of Dentistry, University of São Paulo, Bauru, São Paulo, Brazil

Corresponding Author:

M.A.R. Buzalaf, Department of Biological Sciences, Bauru School of Dentistry, University of São Paulo, Al. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75, Bauru-SP, 17012-901, Brazil.
Email: mbuzalaf@fob.usp.br



Preventive effect of chitosan gel containing CaneCPI-5 against enamel erosive wear in situ

Vinícius Taioqui Pelá¹ · Leonardo Brito² · Even Akemi Taira² · Flávio Henrique-Silva¹ · Joana Claudio Pieretti³ · Amedea Barozzi Seabra³ · Cristiane de Almeida Baldini Cardoso⁴ · Eduardo Pereira de Souza¹ · Sonia Groisman⁵ · Marcela Charantola Rodrigues⁶ · Adrian Lussi⁷ · Thiago Saads Carvalho⁸ · Marília Afonso Rabelo Buzalaf²

Received: 23 December 2021 / Accepted: 20 June 2022

© The Author(s), under exclusive licence to Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2022

Abstract

Objective This study evaluated the preventive effect of a chitosan gel containing CaneCPI-5 against enamel erosion and erosion + abrasion in situ.

Methods Sixteen volunteers participated in a crossover, double-blind protocol, comprising 4 phases: (1) no treatment (Nt); (2) chitosan gel (Cg); (3) chitosan gel + 12,300 ppm NaF (Cg + NaF); and (4) chitosan gel + 0.1 mg/mL CaneCPI-5 (Cg + Cane). Volunteers wore an appliance containing 4 specimens. Once/day, they applied the gel (except for Nt) (4 min/specimen). Erosive challenges were performed extra-orally (0.1% citric acid, 90 s, 4 ×/day; ERO). Specimens were also abraded (toothbrush, 15 s/specimen, 2 ×/day; ERO + ABR). Enamel wear was assessed by profilometry and relative surface reflection intensity (%SRI). Two-way RM-ANOVA/Sidak's tests and Spearman's correlation were used ($p < 0.05$).

Results For profilometry, ERO + ABR promoted significantly greater wear when compared with ERO. There was a significant difference among all treatments. The lowest enamel loss occurred for Cg + Cane, followed by Cg + NaF, Cg, and Nt ($p < 0.05$). The %SRI was significantly lower for ERO + ABR when compared to ERO, only for the Nt group. The greatest %SRI was found for the Cg + NaF and Cg + Cane groups, which did not differ significantly, regardless of the conditions. The lowest %SRI was found for the Nt and Cg groups, which did not differ from each other, regardless of the conditions. The Nt group did not differ significantly from the Cg + NaF (ERO). There was a significant correlation between both analyses.

Conclusion The incorporation of CaneCPI-5 in the chitosan gel prevented erosive wear in situ.

Clinical relevance These results open a new perspective for the use of CaneCPI-5 in other application vehicles, such as chitosan gel.

Keywords Acquired pellicle · Cystatin · Prevention · Tooth

✉ Marília Afonso Rabelo Buzalaf
 mbuzalaf@fob.usp.br

¹ Department of Genetics and Evolution, São Carlos Federal University, São Carlos, São Paulo, Brazil

² Department of Biological Sciences, Bauru School of Dentistry, University of São Paulo, Bauru, São Paulo, Brazil

³ Center for Natural and Human Sciences, Federal University of ABC, Santo André, São Paulo, Brazil

⁴ Postgraduate Department, Cruzeiro do Sul University, São Paulo, São Paulo, Brazil

⁵ Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

⁶ Municipal University of São Caetano Do Sul (USCS), São Caetano do Sul, São Paulo, Brazil

⁷ Department of Operative Dentistry and Periodontology, University Medical Centre, Freiburg, Germany

⁸ Department of Restorative, Preventive and Pediatric Dentistry, School of Dental Medicine, University of Bern, Bern, Switzerland

13/08/2022 20:54

ScholarOne Manuscripts



Journal of Dental Research

[Home](#)[Author](#)[Review](#)

Submission Confirmation

[Print](#)

Thank you for your submission

Submitted to

Journal of Dental Research

Manuscript ID

JDR-22-0772

Title

Use of Reflectometer and the effect of CaneCPI-5 on initial erosion in vivo

Authors

Pelá, Vinícius
Ventura, Talita
Taira, Even
Grizzo, Larissa
Matuhara, Yan
Henrique-Silva, Flavio
Groisman, Sonia
Carvalho, Thiago
Lussi, Adrian
Buzalaf, Marília

Date Submitted

13-Aug-2022

<https://mc.manuscriptcentral.com/jdr>

1/2

USP - FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE BAURU DA
USP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Otimizando o procedimento da coleta de película adquirida para a análise proteômica

Pesquisador: Vinícius Taioqui Pelá

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 86772718.0.0000.5417

Instituição Proponente: Universidade de São Paulo - Faculdade de Odontologia de Bauru

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.725.829

Apresentação do Projeto:

Versão 2 para correção de pendências do parecer anterior.

Objetivo da Pesquisa:

Comparar a composição proteica da película adquirida do esmalte formada in vitro, com diferentes técnicas de coleta.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Estão descritos adequadamente.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de versão 2 para correção de pendências do parecer anterior.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

As pendências foram corrigidas conforme solicitações.

Recomendações:

Não se aplica.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Projeto aprovado sem pendências de ordem ética.

Considerações Finais a critério do CEP:

Esse projeto foi considerado APROVADO na reunião ordinária do CEP de 13/06/2018, com base

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

**USP - FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE BAURU DA
USP**



Continuação do Parecer: 2.725.829

nas normas éticas da Resolução CNS 466/12. Ao término da pesquisa o CEP-FOB/USP exige a apresentação de relatório final. Os relatórios parciais deverão estar de acordo com o cronograma e/ou parecer emitido pelo CEP. Alterações na metodologia, título, inclusão ou exclusão de autores, cronograma e quaisquer outras mudanças que sejam significativas deverão ser previamente comunicadas a este CEP sob risco de não aprovação do relatório final. Quando da apresentação deste, deverão ser incluídos todos os TCLEs e/ou termos de doação assinados e rubricados, se pertinentes.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1078022.pdf	11/05/2018 08:56:04		Aceito
Outros	aquiescenciaio.jpeg	11/05/2018 08:55:40	Vinicius Taioqui Pelá	Aceito
Outros	oficioo.pdf	11/05/2018 08:55:05	Vinicius Taioqui Pelá	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projetoo.pdf	11/05/2018 08:54:29	Vinicius Taioqui Pelá	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEo.pdf	11/05/2018 08:53:58	Vinicius Taioqui Pelá	Aceito
Outros	cepaotimizando.jpg	15/03/2018 14:42:05	Vinicius Taioqui Pelá	Aceito
Outros	questionariootimizando.pdf	15/03/2018 11:37:59	Vinicius Taioqui Pelá	Aceito
Folha de Rosto	folha.pdf	15/03/2018 11:35:10	Vinicius Taioqui Pelá	Aceito
Outros	Declaracaocompromisso.pdf	15/03/2018 11:33:18	Vinicius Taioqui Pelá	Aceito
Outros	cartaencaminhamentootimizando.jpg	15/03/2018 11:32:42	Vinicius Taioqui Pelá	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

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

USP - FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE BAURU DA
USP



Continuação do Parecer: 2.725.829

BAURU, 20 de Junho de 2018

Assinado por:
Ana Lúcia Pompéia Fraga de Almeida
(Coordenador)

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

USP - FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE BAURU DA
USP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: COMPARAÇÃO DO PERFIL PROTEÔMICO DA PELÍCULA ADQUIRIDA DO ESMALTE FORMADO IN VITRO, IN SITU E IN VIVO

Pesquisador: Vinicius Taioqui Pelá

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 86774018.6.0000.5417

Instituição Proponente: Universidade de São Paulo - Faculdade de Odontologia de Bauru

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.731.059

Apresentação do Projeto:

Estudo que visa elucidar o potencial da película adquirida no controle da erosão dentária, através da “engenharia de película”, por meio da comparação das películas adquiridas em diferentes modelos (in vitro, in situ e in vivo) para auxiliar na escolha do melhor protocolo para projetos futuros.

Objetivo da Pesquisa:

Comparar a composição proteica da película adquirida do esmalte formada in vitro, in situ e in vivo.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Este trabalho acarretará em risco mínimo, que acontecerá no caso de você ter alergia ao fio de ortodontia ou do aparelho de silicone utilizado para o experimento e/ou apresentar enjoos na hora da coleta, alguns participantes podem eventualmente apresentar. Nestes casos, você será acompanhado até um local apropriado e esperado até o enjoo passar, ou então, o pesquisador irá acompanhá-lo até um médico. E você será liberado da participação na pesquisa.

Benefícios:

Este projeto traz como benefício à importância de uma nova análise em favor a ciência, através da análise da película adquirida (camada de proteína proveniente da saliva) coletada em diferentes

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

**USP - FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE BAURU DA
USP**



Continuação do Parecer: 2.731.059

protocolos, porém não há benefícios imediatos para os participantes da pesquisa.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Estudo importante na elucidação do potencial da engenharia de películas adquiridas no controle da erosão dentária.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

em acordo com este CEP

Recomendações:

não há

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovação sem pendências.

Considerações Finais a critério do CEP:

Esse projeto foi considerado APROVADO na reunião ordinária do CEP de 13/06/2018, com base nas normas éticas da Resolução CNS 466/12. Ao término da pesquisa o CEP-FOB/USP exige a apresentação de relatório final. Os relatórios parciais deverão estar de acordo com o cronograma e/ou parecer emitido pelo CEP. Alterações na metodologia, título, inclusão ou exclusão de autores, cronograma e quaisquer outras mudanças que sejam significativas deverão ser previamente comunicadas a este CEP sob risco de não aprovação do relatório final. Quando da apresentação deste, deverão ser incluídos todos os TCLEs e/ou termos de doação assinados e rubricados, se pertinentes.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1077701.pdf	11/05/2018 08:48:31		Aceito
Outros	oficioc.pdf	11/05/2018 08:48:05	Vinícius Taioqui Pelá	Aceito
Outros	cessaoc.pdf	11/05/2018 08:47:32	Vinícius Taioqui Pelá	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projetoc.pdf	11/05/2018 08:45:18	Vinícius Taioqui Pelá	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	tcle.pdf	15/03/2018 11:13:25	Vinícius Taioqui Pelá	Aceito

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

USP - FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE BAURU DA
USP



Continuação do Parecer: 2.731.059

Outros	Questionario.pdf	15/03/2018 11:10:43	Vinícius Taioqui Pelá	Aceito
Folha de Rosto	folha.pdf	15/03/2018 11:08:01	Vinícius Taioqui Pelá	Aceito
Outros	DeclaracaoCompromisso.pdf	15/03/2018 11:06:06	Vinícius Taioqui Pelá	Aceito
Outros	carta.jpg	15/03/2018 11:05:17	Vinícius Taioqui Pelá	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

BAURU, 22 de Junho de 2018

Assinado por:

Ana Lúcia Pompéia Fraga de Almeida
(Coordenador)

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

USP - FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE BAURU DA
USP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação da citotoxicidade de uma proteína derivada da cana-de-açúcar (CaneCPI-5) em cultura de fibroblastos gengivais humanos para a prevenção da erosão dentária

Pesquisador: Vinícius Taioqui Pelá

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 39327520.2.0000.5417

Instituição Proponente: Universidade de São Paulo - Faculdade de Odontologia de Bauru

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.447.576

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um projeto intitulado "Avaliação da citotoxicidade de uma proteína derivada da cana-de-açúcar (CaneCPI-5) em cultura de fibroblastos gengivais humanos para a prevenção da erosão dentária", tendo como Responsável Principal o Me. Vinícius Taioqui Pelá, orientadora Profa. Dra. Marília Afonso Rabelo Buzalaf e a equipe de pesquisa composta por Me. Cintia Kazuko Tokuhara e Prof. Dr. Rodrigo Cardoso de Oliveira. Trata-se de uma pesquisa que tem por objetivo avaliar a citotoxicidade da CaneCPI-5, em concentrações variando entre 0,025 e 1,0 mg/mL, em culturas de fibroblastos gengivais humanos para futuros estudos clínicos voltados a erosão dentária. A hipótese nula a ser testada é: A CaneCPI-5 nas concentrações acima mencionadas, não apresenta efeito citotóxico em fibroblastos gengivais humanos. Para a realização desse estudo serão utilizadas Células de Fibroblastos gengivais humanos primários (FGH) que foram obtidas a partir de tecido gengival pela técnica de explante de cinco pacientes saudáveis atendidos na Clínica da Universidade de São Paulo, FOB/USP. Estas células estão congeladas em nitrogênio líquido no laboratório de bioquímica da FOB/USP. Elas pertencem à linha de pesquisa: "Comportamento de células do periodonto na reparação de feridas" discriminada no projeto de registro CAAE: 21624113.5.0000.5417; e serão cedidas para os pesquisadores deste projeto pela Profa. Dra. Carla Andreotti Damante (mediante termo de cessão de tecidos). Vale destacar que todas as alíquotas serão utilizadas na sua totalidade, não restando sobras.

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

USP - FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE BAURU DA
USP



Continuação do Parecer: 4.447.576

Objetivo da Pesquisa:

Hipótese:

A hipótese nula a ser testada é: A CaneCPI-5 nas concentrações acima mencionadas, não apresenta efeito citotóxico em fibroblastos gengivais humanos.

Objetivo Primário:

O objetivo deste projeto será avaliar a citotoxicidade da CaneCPI-5, em concentrações variando entre 0,025 e 1,0 mg/mL, em cultura de células de fibroblastos gengivais humanos..

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Segundo os autores: Esta pesquisa não apresenta riscos, uma vez que as células que serão utilizadas encontram-se congeladas em nitrogênio líquido no laboratório de bioquímica da FOB/USP. Elas pertencem à linha de pesquisa: "Comportamento de células do periodonto na reparação de feridas" discriminada no projeto de registro CAAE: 21624113.5.0000.5417; e serão cedidas para os pesquisadores deste projeto pela Profa. Dra. Carla Andreotti Damante (mediante termo de cessão de tecidos).

Benefícios:

Quanto aos benefícios, por se tratar de uma pesquisa em laboratório, a mesma não traz benefícios diretos e imediatos para o indivíduo, mas poderá a longo prazo gerar novos produtos que poderão auxiliar na prevenção de doença bucais.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de uma pesquisa bem interessante que pretende avaliar o efeito protetor de uma proteína derivada da cana-de-açúcar sobre a erosão dentária e assim favorecer estudos clínicos envolvendo esta proteína com pacientes que apresentam erosão dentária.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram apresentados todos os documentos necessários para que seja avaliada a presente pesquisa. Ou seja: O projeto, carta de encaminhamento, orçamento, cronograma, folha de rosto, justificativa para a dispensa do TCLE, carta de encaminhamento e consequente termo de aquiescência do departamento de ciências biológicas da FOB/USP.

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

**USP - FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE BAURU DA
USP**



Continuação do Parecer: 4.447.576

Recomendações:

Não há.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

A presente pesquisa foi analisada por este CEP em reunião não presencial no dia 29 de outubro. Naquela reunião a pesquisa foi considerada com pendências para ser aprovada. Os pesquisadores reenviaram a pesquisa para uma nova análise e observa-se que todas as pendências foram corrigidas, razão pela qual podemos aprovar o início da pesquisa.

Considerações Finais a critério do CEP:

Esse projeto foi considerado APROVADO na reunião ordinária do CEP de 02/12/2020, via Google Meet, devido à pandemia da COVID-19 e por orientações da CONEP, com base nas normas éticas da Resolução CNS 466/12. Ao término da pesquisa o CEP-FOB/USP exige a apresentação de relatório final. Os relatórios parciais deverão estar de acordo com o cronograma e/ou parecer emitido pelo CEP. Alterações na metodologia, título, inclusão ou exclusão de autores, cronograma e quaisquer outras mudanças que sejam significativas deverão ser previamente comunicadas a este CEP sob risco de não aprovação do relatório final. Quando da apresentação deste, deverão ser incluídos todos os TCLEs e/ou termos de doação assinados e rubricados, se pertinentes.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1641026.pdf	18/11/2020 15:43:38		Aceito
Outros	oficio.pdf	18/11/2020 15:42:25	Vinícius Taioqui Pelá	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto.pdf	18/11/2020 15:37:06	Vinícius Taioqui Pelá	Aceito
Outros	termodeintencaodecessaatecidos.pdf	06/10/2020 15:00:51	Vinícius Taioqui Pelá	Aceito
Folha de Rosto	folhaDeRosto.pdf	06/10/2020 14:37:28	Vinícius Taioqui Pelá	Aceito
Outros	carta_de_encaminhamento.pdf	06/10/2020 14:36:53	Vinícius Taioqui Pelá	Aceito
Outros	Check_listCEP_2019.pdf	06/10/2020 14:36:21	Vinícius Taioqui Pelá	Aceito
Outros	DeclaracaoCompromissoPesquisadorResultadosPesquisa.pdf	06/10/2020 14:35:26	Vinícius Taioqui Pelá	Aceito

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

USP - FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE BAURU DA
USP



Continuação do Parecer: 4.447.576

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

BAURU, 08 de Dezembro de 2020

Assinado por:

Juliana Fraga Soares Bombonatti
(Coordenador(a))

Endereço: DOUTOR OCTAVIO PINHEIRO BRISOLLA 75 QUADRA 9

Bairro: VILA NOVA CIDADE UNIVERSITARIA **CEP:** 17.012-901

UF: SP **Município:** BAURU

Telefone: (14)3235-8356

Fax: (14)3235-8356

E-mail: cep@fob.usp.br

USP - FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE BAURU DA
USP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Efeito protetor da engenharia de película adquirida do esmalte através da incorporação de uma cistatina derivada da cana-de-açúcar (CaneCPI-5) para a proteção da erosão dentária inicial in vivo.

Pesquisador: Vinícius Taioqui Pelá

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 56867722.3.0000.5417

Instituição Proponente: Universidade de São Paulo - Faculdade de Odontologia de Bauru

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 5.335.415

Apresentação do Projeto:

Trata-se de projeto original, versão 1. Todas as informações que embasam este parecer foram obtidas dos documentos Projeto Completo, TCLE e Informações Básicas do projeto. A pesquisa é um estudo cruzado e triplo-cego (participantes, pesquisadores e analistas), constituído por 3 fases paralelas, sendo que todos os participantes participarão em todos os grupos do estudo. será realizada a análise inicial pelo Reflectômetro Optipen. Posteriormente, cada participante irá realizar um bochecho com uma das 3 soluções (10 mL) e seguido pela formação da película adquirida por 120 min. Depois deste período, a superfície vestibular do incisivo central superior direito e esquerdo será demarcada para o desafio erosivo com 10 L ácido cítrico 0,01M, pH 2,5 por 10 s. O ácido coletado será armazenado para a análise de cálcio. Por fim, será realizada a análise final pelo Reflectômetro Optipen sobre a superfície do dente.

Objetivo da Pesquisa:

O objetivo do presente estudo será avaliar o efeito da engenharia da película adquirida do esmalte através da incorporação de uma cistatina derivada da cana-de-açúcar (CaneCPI-5) para a proteção da erosão dentária inicial in vivo.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

A presença dos participante nesta pesquisa acarretará em poucos riscos, que acontecerá no caso

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

USP - FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE BAURU DA
USP



Continuação do Parecer: 5.335.415

de alguém apresentar enjões na hora da análise pelo reflectômetro, acontecer sensibilidade nos dentes devido ao desafio erosivo e reações alérgicas provenientes aos tratamentos (CaneCPI-5 e Elmex), ácido cítrico, pedra pomes e hipoclorito de sódio. Nos casos de enjão, o participante será acompanhado até um local apropriado para esperar o enjão passar, ou então, o pesquisador irá acompanhá-lo até um médico. Com relação a possíveis sensibilidades nos dentes, o pesquisador principal irá fornecer uma solução comercial de bochecho, contendo Flúor para impedir este sintoma. Para as possíveis reações alérgicas, o pesquisador irá acompanhá-lo até um médico e o participante será liberado da pesquisa.

Benefícios:

O presente projeto apresenta vários benefícios, dentre eles a definição de um protocolo in vivo para a proteção da erosão dentária através da CaneCPI-5. Esta pesquisa irá proporcionar a execução de futuros projetos de pesquisa na condição clínica (in vivo). Além disso, o resultado obtido possibilitará a apresentação dos mesmos em eventos científicos internacionais e a publicação de um artigo científico. Por se tratar da primeira

pesquisa in vivo, a mesma pode trazer o benefício de proteção do dente contra a erosão dentária. Entretanto, também pode não trazer benefícios diretos e imediatos para o indivíduo, mas em questões sociais, esta pesquisa será importante para o desenvolvimento de um novo produto odontológico com base em componentes orgânicos (proteína = CaneCPI-5) contra uma importante doença bucal, ou seja, esperamos desenvolver um produto odontológico inovador (eficaz) que possa ser acessível à população para a prevenção da erosão dentária.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O estudo é triplo cego, cruzado, que tem por objetivo investigar a proteção do esmalte por meio do uso de solução para bochecho contendo uma nova cistatina (CANE-CPI5) que apresentou, em estudos prévios realizados em dentes bovinos, capacidade de proteger o esmalte contra erosão ácida e erosão+abrasão. A fase clínica do estudo é necessária para obtenção de patente e posterior comercialização do produto desenvolvido. Serão incluídos no estudo 9 participantes de 18 a 35 anos, saudáveis sistemicamente e oralmente, não fumantes. Os participantes realizarão os bochechos com as soluções experimentais - que incluem o produto a ser testado (CANECPI-5), uma solução comercialmente disponível como controle positivo (ELMEX) e uma solução placebo (água deionizada), sendo em seguida submetidos ao desafio ácido na superfície do esmalte dentário com ácido cítrico aplicado por 10 segundos em área delimitada por uma fita adesiva. Desta área, a gota de ácido será coletada para análise do conteúdo de cálcio. Os participantes

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

**USP - FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE BAURU DA
USP**



Continuação do Parecer: 5.335.415

deverão permanecer em jejum de líquidos e sólidos por duas horas para formação da película adquirida. Será necessária a presença do participante no laboratório por 3 dias consecutivos. As coletas serão realizadas em pós-graduandos, com aquiescência da CPG.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Ver campo de "Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações"

Recomendações:

Ver campo de "Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações"

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não existem pendências éticas.

Considerações Finais a critério do CEP:

Esse projeto foi considerado APROVADO na reunião ordinária do CEP de 06/04/2022, via Google Meet, devido à pandemia da COVID-19 e por orientações da CONEP, com base nas normas éticas da Resolução CNS 466/12. Ao término da pesquisa o CEP-FOB/USP exige a apresentação de relatório final. Os relatórios parciais deverão estar de acordo com o cronograma e/ou parecer emitido pelo CEP. Alterações na metodologia, título, inclusão ou exclusão de autores, cronograma e quaisquer outras mudanças que sejam significativas deverão ser previamente comunicadas a este CEP sob risco de não aprovação do relatório final. Quando da apresentação deste, deverão ser incluídos todos os TCLEs e/ou termos de doação assinados e rubricados, se pertinentes.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1909435.pdf	09/03/2022 09:27:47		Aceito
Outros	DeclaracaoCompromissoPesquisadorResultadosPesquisa.pdf	09/03/2022 09:25:41	Vinicius Taioqui Pelá	Aceito
Outros	Termodeaquiescencia.pdf	09/03/2022 09:25:05	Vinicius Taioqui Pelá	Aceito
Outros	cartadeencaminhamento.pdf	09/03/2022 09:24:46	Vinicius Taioqui Pelá	Aceito
Outros	Check_listCEP.pdf	09/03/2022 09:24:29	Vinicius Taioqui Pelá	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	09/03/2022 09:23:52	Vinicius Taioqui Pelá	Aceito

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

USP - FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE BAURU DA
USP



Continuação do Parecer: 5.335.415

Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto.pdf	09/03/2022 09:23:32	Vinicius Taioqui Pelá	Aceito
Folha de Rosto	folhaDeRosto.pdf	09/03/2022 09:23:03	Vinicius Taioqui Pelá	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

BAURU, 06 de Abril de 2022

Assinado por:
Juliana Fraga Soares Bombonatti
(Coordenador(a))

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



Universidade de São Paulo Faculdade de Odontologia de Bauru

Comissão de Ética no Uso de Animais

**PROTOCOLO DE RECEBIMENTO DO FORMULÁRIO
PARA REGISTRO DE PROTOCOLOS EFETUADOS COM
CADÁVERES, OU PARTE DELES, EM ENSINO E/OU
PESQUISA**

Uso exclusivo da CEUA/FOB/USP

Reg. Nº **005/2018 (EMENDA)**

Recebido em: **06/10/2021**

Maristela Petenuci Ferrari

Maristela Petenuci Ferrari

Secretária da CEUA – SRTE 53052

Finalidade: Pesquisa

Período: 10/2021 a 05/2022

Título da pesquisa: Engenharia de película adquirida para o controle da erosão dentária: avaliação in situ do potencial protetor de uma nova cistatina derivada da cana-de-açúcar (Submete emenda com acréscimo de dentes bovinos e 2 novos grupos)

Pesquisador Responsável: Profa. Dra. Marília Afonso Rabelo Buzalaf

Pesquisador Executor: Vinícius Taioqui Pelá

Colaboradores: Talita Mendes da Silva Ventura, Even Akemi Taira e Tatiana Martini

Nota Fiscal/Termo de Doação NF Nº 000.000.058 - SÉRIE: 1 **Total adquirido:** 200 (19 para esta pesquisa)

Nº Lote / Data do Abate 01, 02, 03 e 04 / 15/10/2020

Nº utilizados / Nº de grupos: 19 dentes (76 amostras de esmalte bovino) / Erosão: sem tratamento (n/grupo=32) / Erosão + Abrasão: Sem tratamento (n/grupo=32)