CAMILA VIEIRA DA SILVA Influência da película adquirida e do momento da aplicação da solução de AmF/NaF/SnCl₂ na progressão da lesão de erosão em esmalte

CAMILA VIEIRA DA SILVA

Influência da película adquirida e do momento da aplicação da solução de AmF/NaF/SnCl₂ na progressão da lesão de erosão em esmalte

Versão Corrigida

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, pelo Programa de Pós-Graduação em **Odontologia (Dentística)** para obter o título de Doutor em **Ciências.**

Área de Concentração: Dentística

Orientador: Profa. Dra. Patricia Moreira de

Freitas Costa e Silva

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catalogação-na-Publicação Serviço de Documentação Odontológica Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Silva, Camila Vieira da.

Influência da película adquirida e do momento da aplicação da solução de AmF/NaF/SnCl₂ na progressão da lesão de erosão em esmalte / Camila Vieira da Silva ; orientador Patricia Moreira de Freitas Costa e Silva -- São Paulo, 2019.

128 p.: tab., fig.; 30 cm.

Tese (Doutorado) -- Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Área de Concentração: Dentística. -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Versão corrigida

Erosão dentária.
 Solução de AmF/NaF/SnCl₂.
 Estanho.
 Película adquirida.
 Esmalte dentário.
 Silva, Patricia Moreira de Freitas Costa e. II. Título.

da Silva CV. Influência da película adquirida e do momento da aplicação da solução

de AmF/NaF/SnCl₂ na progressão da lesão de erosão em esmalte. Tese

apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para

obtenção do título de Doutor em Ciências.

Aprovado em: 20 / 08 / 2019

Banca Examinadora

Profa. Dra. Cecília Pedroso Turssi

Instituição: Faculdade de Odontologia e Medicina São Leopoldo Mandic

Julgamento: Aprovada

Prof. Dr. Heitor Honório Marques

Instituição: Faculdade de Odontologia de Bauru - USP

Julgamento: Aprovada

Profa. Dra. Tais Scaramucci Forlin

Instituição: Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Julgamento: Aprovada

À minha família, que sempre foi o pilar de segurança e incentivo. Ao meu pai Antônio, obrigada pelo apoio, por estar sempre me incentivando a correr atrás dos meus objetivos, por me ensinar que o trabalho enobrece e dá mais sentido às conquistas. À Minha mãe Clélia, que não mede esforços para cuidar da família, obrigada pelo amor, pela educação, pelo incentivo, por sempre demonstrar seu orgulho de mim e por toda a sua dedicação desde que nasci. Ao meu irmão, Bruno, por cuidar de mim, por sempre demonstrar seu carinho, pela conexão que temos desde pequenos e pelas risadas compartilhadas. Minha vida toda é construída nas bases sólidas que eles mantêm! Orgulho imenso de pertencer a esta família.

Obrigada por tudo! Amo vocês!

À minha orientadora, Profa. Dra. Patricia Moreira de Freitas, minha inspiração profissional. Ao longo destes 7 anos sendo sua aluna, entre Graduação, Iniciação Científica, Mestrado e Doutorado, pude aprender imensamente contigo. Agradeço não só pela orientação deste trabalho e por todos que realizei sob sua orientação, mas também por sempre acreditar no meu potencial, pelo seu incentivo em buscar novos conhecimentos e principalmente por me ensinar que não devemos encarar os contratempos como problemas e sim como desafios. A jornada acadêmica ao seu lado me proporcionou oportunidades, diversos artigos publicados, conhecer outros ambientes acadêmicos e professores nacionais e internacionais, participações em eventos, viagens, tudo isso porque você sempre confiou e acreditou em mim.

Obrigada pela confiança e carinho de sempre.

AGRADECIMENTOS

À Universidade de São Paulo, representada pelo Reitor, Prof. Dr. Marco Antônio Zago. O ambiente deste campus me proporciona hospitalidade e tranquilidade desde que ingressei em 2009, como aluna de graduação.

À Faculdade de Odontologia de São Paulo - FOUSP - representado por seu Diretor, Prof. Dr. Rodney Garcia Rocha. Esta tem sido minha segunda casa desde a graduação, agradeço não só pela minha formação como dentista, profissão com a qual tenho grande dedicação e amor, mas também por todas as oportunidades que esta casa me proporcionou. Tenho orgulho imenso de ser filha da FOUSP.

Ao departamento de Dentística, representado pelo chefe do departamento, Prof. Dr. Giulio Gavini. Agradeço pela infraestrutura que é disponibilizada aos alunos deste departamento.

Aos professores do Departamento de Dentística por todos os ensinamentos transmitidos a mim. Em especial à Profa. Dra. Eliza Maria Agueda Russo, por tudo que aprendi acompanhando por 3 anos a clinica da disciplina de Dentística IV e pela oportunidade de auxiliar em seu curso de atualização. E à Profa. Dra. Ana Cecília Côrrea Aranha, por ser uma inspiração como docente e como profissional.

À Profa. Dra. Cecília Pedroso Turssi, da Faculdade de Odontologia São Leopoldo Mandic, meus mais sinceros agradecimentos. Agradeço por, além de abrir as portas do seu laboratório, toda a ajuda, humildade e disponibilidade em me ajudar em diversas etapas da minha pesquisa. Acredito que você não faça ideia do quanto, mas eu sei o quanto você foi importante na minha jornada acadêmica e por isso sou muito grata.

À Profa. Dra. Taís Scaramucci, por todas as sugestões que fez em meus trabalhos. Sou muito grata por contar com você em todas as minhas bancas, por sempre trazer ótimas colocações e ideias. Agradeço por toda a sua disponibilidade comigo.

Aos funcionários do Departamento de Dentística, da secretaria de Pós-Graduação e da Biblioteca da FOUSP, pela disponibilidade e pelo profissionalismo. Em especial à Silvana, por toda a organização que você trouxe ao laboratório de pesquisa, por todas as conversas entre os experimentos e por todo o carinho que você tem com os alunos. E à Selminha, por sempre ser solicita e ajudar quando precisei.

À todos os colegas de Pós-graduação, pelas experiências compartilhadas e por tornar os dias no laboratório mais agradáveis. Em especial à Raquel, com quem minha amizade só cresceu ao longo da pós, que me apoia, incentiva e aconselha em todos os momentos. Ao Vinícius, meu amigo melancia, que aos poucos fui descobrindo quão parecidos nós somos, e por isso nos damos tão bem. E à Miriam, que foi uma grata surpresa ao final do Doutorado, seu carinho fez toda a diferença.

Às minhas queridas alunas de mestrado, Yael e Juliane. À Yael, pela incrível dedicação e comprometimento, por todas as palavras de incentivo e toda a ajuda que você me deu nas etapas experimentais. À Ju, pela paz que você transmite, pelo seu comprometimento e pela sua disposição em sempre querer ajudar. Vocês foram as melhores alunas que eu poderia pedir.

Às amigas que foram da pós-graduação pra vida, Taís, Thayanne, Renata, Giovana e Andreia. Taís, fizemos uma dupla incrível durante toda a pós, minha companheira de viagens, de laboratório, de artigos, de músicas e de risadas. Thayanne, você sempre tão altruísta, me ensinou muito durante meu mestrado, ensinamentos que levo sempre comigo e que pude passar para frente no Doutorado. Renata, pelo seu companheirismo e solidariedade que teve comigo durante os períodos mais difíceis. Giovana, que foi uma grande inspiração, em dedicação e competência. Andreia, sempre admirei como você se divide em mil, e ainda assim consegue ser incrivelmente boa em tudo.

À minha querida amiga, Mariana, que está ao me lado em todos os momentos da minha vida, por sempre me fazer companhia. Obrigada por esses quase 20 anos de companheirismo e carinho.

À minha querida amiga Beatriz Jesus, por nossa sintonia e transmissão de pensamentos, porque não precisamos nem nos falar para saber o que a outra está pensando. Desde que nos conhecemos, não houve um só dia no qual não nos falamos. Você é uma pessoa muito especial e tenho muita sorte por nossos caminhos terem se cruzado, pois não existe pessoa neste mundo com quem eu me identifique tanto. Obrigada por estar sempre presente.

À Dra Ligia, que é amiga e parceira. Você é uma verdadeira inspiração profissional e pessoal. Agradeço por tudo que aprendi e aprendo com você, por todas as oportunidades que você me proporciona, por sempre me incentivar a continuar estudando e por me incluir na linda família que você tem. Trabalhar com você tem um presente que a vida me deu, espero que nossa parceria dure muitos anos.

Aos meus queridos voluntários. Obrigada por terem aceitado participar desta pesquisa e pela paciência que tiveram. Sem vocês, essa tese não teria sido possível.

Ao Raul, meu namorado, amigo, companheiro e parceiro. Nunca achei que fosse encontrar alguém tão especial para partilhar a vida comigo, você foi um presente que a vida preparou pra mim. Obrigada por sempre me apoiar, me incentivar, me ouvir, por sempre estar ao meu lado e por todas as aventuras vividas contigo.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP – Processo nº 2016/08524-7), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Tecnológico (CNPq - Processo nº 140259/2016-3).

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a conclusão deste trabalho, os meus sinceros agradecimentos!

"O sucesso é a soma de pequenos esforços repetidos d I	dia após dia." Robert Collier

RESUMO

da Silva CV. Influência da película adquirida e do momento da aplicação da solução de AmF/NaF/SnCl₂ na progressão da lesão de erosão em esmalte [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2019. Versão Corrigida.

Considerando que a capacidade protetora da película salivar adquirida em erosão dental pode ser influenciada por diversos fatores, e que a característica da película adquirida pode modificar a deposição de sais na superfície do esmalte dental, é importante avaliar se sua presença é capaz de influenciar a eficácia da solução de AmF/NaF/SnCl₂ no controle da erosão dental. A primeira etapa do estudo, in vitro, teve como objetivo obter um protocolo simplificado de formação da lesão erosiva em esmalte dental humano, variando a concentração do ácido, frequência e duração das imersões erosivas. Para tanto, 64 amostras de esmalte dental humano foram divididas em 8 grupos experimentais (n=8), de acordo com a ciclagem proposta: G1 - ácido cítrico 0,5%, 3x/dia, 2 min; G2 - ácido cítrico 0,5%, 6x/dia, 2 min; G3 - ácido cítrico 0,5%, 3x/dia, 5 min; G4 - ácido cítrico 0,5%, 6x/dia, 5 min; G5 - ácido cítrico 1%, 3x/dia, 2 min; G6 - ácido cítrico 1%, 6x/dia, 2 min; G7 - ácido cítrico 1%, 3x/dia, 5 min; G8 - ácido cítrico 1%, 6x/dia, 5 min. A variável de resposta foi a perda de tecido mineral (em μm) por meio de perfilometria óptica. Anova 1-fator mostrou que houve diferença estatística entre os grupos, (p<0,01) e Tukey mostrou que apenas G2 e G3 foram semelhantes e todos os demais grupos diferiram entre si. Sendo assim, foi escolhida para a etapa in situ a ciclagem considerada mais simples, semelhante ao G7, mas que mantivesse o padrão de lesão erosiva avançada. A segunda etapa do estudo, in situ, foi delineada para avaliar se a película adquirida e o momento da aplicação interferem na ação da solução de AmF/NaF/SnCl2 no controle da erosão. Doze participantes, utilizando um dispositivo removível inferior bilateral contendo 2 amostras de esmalte dental humano, participaram deste estudo in situ, cruzado, duplo cego, dividido em 3 fases de 5 dias cada (boca dividida). Cento e quarenta e quatro amostras de esmalte dental humano (3 X 3 X 1 mm), obtidas a partir de terceiros molares hígidos, foram divididas nos 6 grupos experimentais (n = 12): G1 – sem tratamento, com presença de película adquirida; G2 – sem tratamento, sem presença da película adquirida; G3 – Aplicação da

solução de AmF/NaF/SnCl₂ previamente à 1ª imersão ácida diária, com presença de película adquirida; G4 - Aplicação da solução de AmF/NaF/SnCl2 previamente à 1ª imersão ácida diária, sem película adquirida; G5 - Aplicação da solução de AmF/NaF/SnCl2 logo após a 1ª imersão ácida diária, com presença de película adquirida; G4 - Aplicação da solução de AmF/NaF/SnCl₂ logo após a 1ª imersão ácida diária, sem película adquirida. Desafios erosivos (ácido cítrico a 1,0%, pH 2,3, 4x5 min/dia, intervalos de 1,5h) e remoção da película adquirida (2% de Dodecil Sulfato de Sódio) foram realizados extraoralmente, enquanto o bochecho foi realizado intraoralmente (30 seg). A perda tecidual foi determinada por perfilometria óptica (n = 12) e alterações morfológicas por microscopia eletrônica de varredura (n = 3). Os dados foram analisados estatisticamente por ANOVA 2-fatores para blocos casualizados com posterior comparação pareada dos tratamentos através do teste Tukey (α =5%). Não houve interação significativa entre as variáveis "Tipo de Tratamento" e "Película Adquirida" (p = 0,211). Considerando o fator principal "Tipo de Tratamento", quando comparado ao grupo sem tratamento, o desgaste do esmalte foi estatisticamente menor com a aplicação de solução de estanho (p <0,001), independentemente de ter sido aplicado antes ou após a 1ª imersão ácida diária, seja em presença ou ausência de película. Portanto, a presença de película adquirida e o momento de aplicação da solução de AmF/NaF/SnCl2 não influenciaram a sua capacidade de controlar a erosão em esmalte dental no presente modelo experimental.

Palavras-chave: Erosão Dental. Solução de AmF/NaF/SnCl₂. Estanho. Película Adquirida. Esmalte Humano.

ABSTRACT

da Silva CV. Influence of the acquired pellicle and the moment of application of the AmF/NaF/SnCl₂ solution in the prevention of in situ erosion in human enamel [thesis]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2019. Versão Corrigida.

Considering that the protective ability of the salivary acquired pellicle under dental erosion can be influenced by several factors, and that the characteristics of the present pellicle can modify the deposition of salts on the surface of the dental enamel, it is possible that the salivary acquired pellicle can influence the effectiveness of the solution of AmF/NaF/SnCl₂ against erosion. The first stage of this study, in vitro, aimed to obtain a simplified protocol for the formation of erosive lesion in human dental enamel, varying acid concentration, frequency and duration of erosions. For this, 64 samples of human dental enamel were divided into 8 experimental groups (n = 8), according to the proposed cycling: G1 - 0.5% citric acid, 3x/day, 2 min; G2 - 0.5% citric acid, 6x/day, 2 min; G3 - 0.5% citric acid, 3x/day, 5 min; G4 - 0.5% citric acid, 6x/day, 5 min; G5 - citric acid 1%, 3x/day, 2 min; G6 - citric acid 1%, 6x/day, 2 min; G7 - citric acid 1%, 3x/day, 5 min; G8 - citric acid 1%, 6x/day, 5 min. The response variable was the loss of mineral tissue (in µm) by means of optical profilometry. One-way ANOVA showed that there was a statistical difference between the groups, and Tukey showed that only G2 and G3 were similar and all the other groups differed from each other. Thus, the cycling considered simpler, similar to G7, was chosen for the stage in situ, adding erosive immersion to the protocol.

The second stage of the study, in situ, was designed to assess whether the acquired pellicle and moment of application interfere with the action of AmF/NaF/SnCl₂ solution in erosion control. Twelve volunteers were required for this 3-phase, randomized, split-mouth, cross-over model. Six treatment protocols were tested using human enamel samples in replicas: G1 - without treatment, with the presence of acquired pellicle; G2 - without treatment, without acquired pellicle; G3 - AmF/NaF/SnCl₂ solution prior to the first daily acid immersion, with acquired pellicle; G4 - AmF/NaF/SnCl₂ solution prior to the first daily acid immersion, without acquired pellicle; G5 - AmF/NaF/SnCl₂ solution after the first daily acid immersion, with

acquired pellicle; G6 - AmF/NaF/SnCl₂ solution after the first daily acid immersion, without acquired pellicle. Erosive challenges (1.0% citric acid, pH 2.3, 4x5 min/day) and removal of the acquired pellicle (2% Sodium Dodecyl Sulfate) were performed extra-orally, while mouthwash was applied intraorally (30 sec). Tissue loss were determined by optical profilometry (n=12) and morphological changes were evaluated by scanning electron microscopy (n=3) analysis. Data were statistically analysed by two-way ANOVA for randomized blocks, with subsequent pairwise comparison of treatments. No significant interaction between the independent variables "Type of Treatment" and "Acquired Pellicle" was found (p=0.211). Considering the main factor "Type of Treatment", when compared to the group without treatment, enamel loss was statistically significant lower with application of tin solution (p<0.001), regardless of whether it was applied either before or after erosive cycling, whether in presence or absence of pellicle. Therefore, neither the presence of acquired pellicle, nor the moment of application, influences the anti-erosive ability of the AmF/NaF/SnCl₂ solution in the present model.

Key words: Dental erosion. AmF/NaF/SnCl₂ rinse. Tin. Acquired pellicle. Human Enamel.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 – Diferentes estágios do processo de erosão dental. A: Amolecimento superficial do esmalte (sem perda visível); B: Perda tecidual (desgaste dentário erosivo) e amolecimento da superfície subjacente; C: Perda na dentina (Traduzida de Schlueter et al., 2012)
Figura 2.2 – Interação de diferentes fatores capazes de influenciar desenvolvimento da erosão dental (Diagrama traduzido de Lussi et al. 2011)
Figura 2.3 – Equação da reação reversível de dissociação da hidroxiapatita na saliva
Figura 2.4 – Fatores salivares associados ao controle da erosão dentária no esmalte e na dentina. (Diagrama traduzido de Buzalaf et al., 2012)
Figura 4.1 – Seleção das amostras. A: Lupa Estereoscópica; B: Perfilômetro Óptico C: Microdurômetro58
Figura 4.2 – Amostra de esmalte humano com área delimitada60
Figura 4.3 – Irradiador de radiação gama tipo Gammacell (IPEN-USP)60
Figura 4.4 – Dispositivo intraoral bilateral63
Figura 4.5 – Amostras posicionadas no dispositivo intraoral63
Figura 4.6 – Amostra posicionada recuada em relação ao limite do nicho64

Figura 4.7 –	Ciclagem erosiva realizada nos grupos G1 e G2 61
Figura 4.8 –	Ciclagem erosiva realizada nos grupos G3 e G4 61
Figura 4.9 –	Ciclagem erosiva realizada nos grupos G5 e G7 62
Figura 4.10 -	- Amostra com lesão erosiva formada <i>in situ</i> , após a remoção das fitas de UPVC68
Figura 4.11 -	- Microscópio eletrônico de varredura (ESEM) Quanta 650 FEG do LCT - Poli USP69
Figura 5.1 –	Eletromicrografias das amostras após erosão <i>in situ</i> , obtidas no MEV. (A – Sem tratamento, em ausência da película adquirida; B - Sem tratamento e com presença de película; C - AmF/NaF/SnCl ₂ aplicada após a 1ª imersão ácida diária, na ausência da película; D - AmF/NaF/SnCl ₂ aplicada após a 1ª imersão ácida, com presença da película; E - AmF/NaF/SnCl ₂ aplicada antes da 1ª imersão ácida diária, com presença de película adquirida; F- AmF/NaF/SnCl ₂ aplicada antes da 1ª imersão ácida diária, na ausência de película adquirida

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1 -	Descrição das soluções de ciclagem <i>in vitro</i> 56
Tabela 4.2-	Critérios de inclusão e exclusão dos sujeitos da pesquisa62
Tabela 5.1-	Média e desvio padrão dos valores de perda de substrato por análise perfilométrica <i>in vitro</i> (μm)71
Tabela 5.2-	Médias e desvios padrão do desgaste do esmalte (em µm), segundo o tratamento, na presença ou ausência de película adquirida72

LISTA DE SÍMBOLOS

μm milímetro
mm milímetro
mL mililitro
nm nanometro
N Newton
M Molar
mM milimolar
pH potencial de hidrogênio
rpm rotações por minuto
ppm partes por milhão
s segundo(s)
h hora(s)
F fluoreto
AmF fluoreto de amina
NaF fluoreto de sódio
SnCl ₂ cloreto de estanho
Sn estanho
SnF ₂ fluoreto de estanho
P fósforo
CaF ₂ fluoreto de cálcio
TiF ₄ tetrafluoreto de titânio
kg/mm ² quilograma por milímetro quadrado
x vezes
°C graus Celcius

%..... porcentagem

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	27
2	REVISÃO DE LITERATURA	31
2.1	Erosão dental	31
2.2	Patomecanismo e fatores etiológicos da erosão dental	33
2.3	A importância da saliva na erosão dental	37
2.4	A película adquirida e a erosão dental	38
2.5	Prevenção e controle da erosão dental	40
2.5.1	Fluoretos	41
2.5.1.1	Mecanismo de ação dos fluoretos	42
2.5.1.2	Estanho associado a fluoretos	44
2.6	Compostos fluoretados e a película adquirida	46
2.7	Momento da aplicação das soluções fluoretadas	47
3	PROPOSIÇÃO E HIPÓTESES NULAS	51
4	MATERIAL E MÉTODOS	53
4.1	Aspectos éticos	53
4.2	Etapa in vitro	53
4.2.1	Delineamento experimental in vitro	53
4.2.2	Obtenção dos dentes e preparos das amostras	54
4.2.3	Seleção das amostras de esmalte	55
4.2.4	Delimitação da área de estudo	56
4.2.5	Ciclagem erosiva in vitro	56
4.2.6	Análise Perfilométrica	57
4.3	Etapa in situ	57
4.3.1	Delineamento experimental in situ	58
4.3.2	Obtenção dos dentes e preparos das amostras	59
4.3.3	Seleção das amostras de esmalte	59
434	Delimitação da área de estudo	50

4.3.5	Esterilização das amostras
4.3.6	Cálculo amostral61
4.3.7	Seleção dos participantes da pesquisa61
4.3.8	Preparo dos dispositivos intra-orais
4.3.9	Remoção da película adquirida64
4.3.10	Tratamento de superfície – solução de AmF/NaF/SnCl ₂ (G3, G4, G5 e G6) 64
4.3.11	Desafio erosivo in situ
4.3.12	Análise perfilométrica68
4.3.13	Microscopia Eletrônica de Varredura
4.4	Análise estatística 69
4.4.1	Análise estatística da etapa in vitro
4.4.2	Análise estatística da etapa in situ
5	RESULTADOS71
5.1	Resultados da etapa in vitro71
5.2	Resultados da etapa in situ71
6	DISCUSSÃO 75
7	CONCLUSÕES83
	REFERÊNCIAS85
	APÊNDICES
	ANEXOS 119

1 INTRODUÇÃO

Erosão dental é caracterizada pela perda progressiva, crônica e multifatorial dos tecidos duros dentais, causada pela ação de ácidos de origem não-bacteriana ou substâncias quelantes (Imfeld, 1996; Lussi et al., 2011). Estes ácidos podem ter origem intrínseca ou extrínseca. Os ácidos de origem intrínseca (ácido clorídrico presente no suco gástrico) entram em contato com os dentes por meio de doenças gastresofágicas, como doença do refluxo gastroesofágico, ou por episódios de êmese crônicos causados por transtornos alimentares. Já aqueles de origem extrínseca chegam à cavidade bucal, na maioria das vezes, por meio da ingestão de alimentos e bebidas ácidas (Zero, 1996) ou devido a condições inerentes à profissão (Wiegand; Attin, 2007).

Considerando a importância da função protetora da saliva aos tecidos dentais frente a desafios erosivos (Buzalaf et al., 2012), estudos que reproduzam as condições que ocorrem na cavidade bucal mostram-se mais verossímeis para a avaliação de fatores que possam interferir na progressão das lesões erosivas (Hove et al., 2008; Wiegand; Attin, 2011). Neste sentido, trabalhos in situ têm sido realizados (Hove et al., 2008; Schlueter et al., 2009a, 2011; Ganss et al., 2010a; Mathews et al., 2012) devido à aproximação que possuem com as condições fundamentais para o surgimento de lesões de erosão sem afetar a dentição natural, visto que, além de permitirem o contato das amostras com o ambiente bucal, possibilitam condições experimentais padronizadas (Wiegand; Attin, 2011) e métodos exatos de análises do substrato dental (Hove et al., 2008; Shellis et al., 2011). Estudos recentes buscam padronização nos procedimentos uma experimentais a fim de simular as condições que ocorrem na cavidade bucal durante os desafios erosivos (Wiegand; Attin, 2011). As ciclagens erosivas utilizadas são relativamente severas visando simular condições que podem ocorrer em pacientes com alto risco de erosão dental (Ganss et al., 2008, 2010a; Schlueter et al., 2009b). Entretanto, para os estudos in situ, estas ciclagens tornam-se longas e desconfortáveis, dificultando a colaboração por parte dos participantes da pesquisa.

Com o aumento da prevalência e incidência de lesões de erosão (Jaeggi; Lussi, 2006, 2014; Salas et al., 2015) reforça-se a necessidade da otimização dos métodos preventivos já existentes e do desenvolvimento de terapias realmente

eficazes em inibir a perda mineral frente a um desafio erosivo, antes que a perda irreversível da estrutura dental possa ocorrer (Magalhães et al., 2009; Lussi; Carvalho, 2015). Dentre os compostos fluoretados utilizados com esta finalidade, o estanho associado a fluoretos tem se destacado, demonstrando notável eficácia no controle do processo de desmineralização (Ganss et al., 2010a; Schlueter et al., 2011; Hove et al., 2008). Sua ação ocorre pela precipitação de uma camada amorfa relativamente ácido-resistente (Hove et al., 2006; Schlueter et al., 2009c), composta por sais de Sn/F/P ou Ca/P/Sn, dependendo da composição da fórmula aplicada (Babcock et al., 1978; Ganss et al., 2012a). No esmalte, sob desafios erosivos, há a incorporação de íons de estanho, e possivelmente de fluoreto, à superfície dental, que ocorre por um complexo processo de desmineralização-remineralização (Schlueter et al., 2009c; Ganss et al., 2010b), tornando o substrato mais ácidoresistente. Diversos estudos in vitro e in situ (Ganss et al., 2008, 2010a; Schlueter et al., 2009a,b,c,d,e, 2010, 2011; Yu et al., 2010a; Rakhmatullina et al., 2013; da Silva et al., 2017a,b) demonstraram resultados promissores utilizando a solução comercial do composto de AmF/NaF/SnCl₂ na proteção do substrato dental contra o processo erosivo.

Entretanto, apesar desta solução atualmente ser considerada "padrão-ouro" para prevenção de erosão dental (Ganss et al., 2010a; Rakhmatullina et al., 2013), pouco se sabe sobre como os componentes salivares e a película adquirida interferem na interação do estanho e dos compostos fluoretados com o substrato dental. Considerando que a película adquirida tem a capacidade de regular a precipitação de minerais sobre a superfície dental (Zahradnik, 1979; Sigueira et al., 2012a) por agir como uma barreira de difusão ou membrana de permeabilidade seletiva (Hannig; Balz, 1999; Hara et al., 2006; Buzalaf et al., 2012), é possível que ela afete a deposição de sais e a incorporação de íons de estanho sobre a superfície do esmalte dental. A composição proteica da película influencia esta característica de seletividade por agir como uma barreira física e por modificar a interação química com os precipitados, podendo influenciar a formação e a estabilização desses precipitados formados na superfície após a exposição ao fluoreto devido à adsorção de proteínas e de fosfato (Algarni et al., 2015). Em um estudo recente, Algarni et al (2015) demonstraram que o proteoma da película adquirida varia de acordo com a solução de tratamento, tendo encontrado maior quantidade de proteínas na película tratada com o estanho associado à fluoretos, dentre elas, proteínas já relacionadas com as propriedades protetoras da película para o substrato dental frente a desafios erosivos.

Além da composição, a capacidade protetora da película é regulada por fatores como a espessura e maturação (Hove et al., 2007), podendo ser afetada também pela natureza do desafio erosivo, tais como tempo de exposição (Hara et al., 2006), tipo (West et al., 2000; Hannig et al., 2005a) e concentração do ácido (West et al., 2000; Nekrashevych; Stösser, 2003). Esta proteção é limitada a desafios erosivos mais leves (Hara et al., 2006); já em ciclagens mais agressivas, as proteínas adsorvidas na superfície do esmalte podem ser parcialmente removidas, restando uma camada basal não inteiramente madura (Bennick et al., 1983; Nieuw-Amerongen et al., 1987; Hannig et al., 2005a; Hove et al., 2007), visto que, sob baixo pH, as fortes ligações aniônicas entre as proteínas e a superfície do esmalte são enfraquecidas (Hara et al., 2006). Sendo assim, é provável que a película adquirida presente em um substrato que foi submetido a diversos desafios erosivos subsequentes seja diferente da encontrada previamente aos desafios, o que pode influenciar no seu fator protetor e na sua interação com os precipitados dos compostos fluoretados.

Entretanto, a aplicação das soluções fluoretadas, em especial as contendo estanho, previamente à formação da película, pode levar a modulações na formação e alterações ultraestruturais e nas propriedades físico-químicas da película *in situ*, sendo capaz de aumentar sua capacidade protetora frente à desafios ácidos (Siqueira et al., 2012b; Kensche et al., 2017, 2019).

Além da diferença na película presente, o momento no qual a solução é aplicada, antes ou depois do desafio erosivo, pode influenciar na sua eficácia devido ao mecanismo de ação que o estanho associado à fluoreto possui. Como os depósitos de estanho são ácido-resistentes, a aplicação antes do desafio poderia propiciar maior efeito protetor contra a desmineralização (O'Toole et al., 2015), podendo ainda facilitar a incorporação dos íons na camada subsuperficial do esmalte.

Desta forma, este estudo *in situ* foi delineado para avaliar a influência da película adquirida e do momento da aplicação da solução de AmF/NaF/SnCl₂ no seu potencial em controlar a progressão da lesão de erosão no esmalte dental humano.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Erosão dental

Erosão dental é caracterizada pela dissolução patológica, progressiva, crônica e multifatorial dos tecidos duros dentais, decorrente da exposição a ácidos de origem não-bacteriana, provenientes da dieta, de medicações, de fontes intrínsecas ou ocupacionais (ten Cate; Imfeld, 1996; Imfeld, 1996; Lussi et al., 2004, 2011; Lussi; Jaeggi, 2008).

Os ácidos de origem intrínseca (ácido clorídrico presente no suco gástrico) entram em contato com os dentes por meio da doença do refluxo gastresofágico ou por episódios crônicos de êmese e regurgitações frequentes, decorrentes de desordens alimentares (Ali et al., 2002; Hermont et al., 2014).

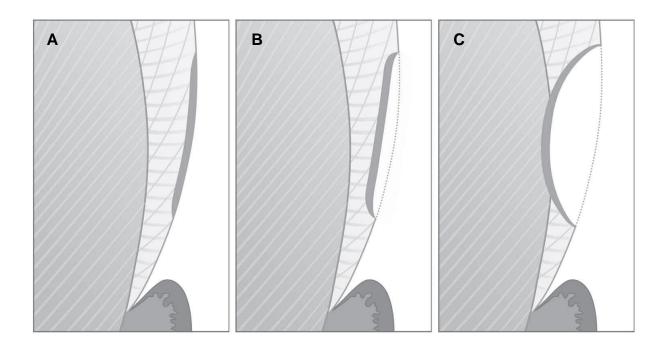
Os ácidos de origem extrínseca chegam à cavidade bucal por meio da ingestão de alimentos e bebidas ácidas. Têm sido considerados os principais fatores relacionados ao desenvolvimento clínico das lesões por erosão dental, em função da mudança de hábitos dietéticos da população, que tem consumido, com maior frequência, refrigerantes, vinhos, bebidas isotônicas, frutas cítricas e sucos naturais e industrializados (Zero, 1996; Lussi; Jaeggi, 2008; Ganss et al., 2012a).

Também de origem extrínseca, fatores ligados ao meio ambiente (exposição ocupacional a aerossóis ácidos, água de piscina tratada com pH baixo) e medicações de uso frequente (vitamina C – ácido ascórbico, aspirina mastigável – ácido acetilsalicílico) contribuem para a ocorrência desse tipo de lesão, mas em menor frequência (Imfeld, 1996; Zero, 1996; Lussi et al., 2011).

O processo de erosão é caracterizado pela desmineralização inicial do esmalte pela ação direta dos ácidos na superfície dental, que leva a um amolecimento superficial (Lussi et al., 2004; Schlueter et al., 2012) (Figura 2.1A). Essa camada amolecida pode ter uma espessura entre 0,2 e 3,0 µm (Amaechi; Higham, 2001; Eisenburger et al., 2001; Wiegand; Attin, 2007; Cheng et al., 2009; Voronets; Lussi, 2010) e resulta no aumento da rugosidade superficial (Nekrashevych; Stösser, 2003) e diminuição da dureza do substrato dental (Lussi et al., 1993), tornando a superfície mais suscetível à ação de forças mecânicas (Attin et

al., 1997; Jaeggi; Lussi, 1999; Eisenburger et al., 2003; Voronets et al., 2008; Wiegand et al., 2008a). Esse processo é seguido pela dissolução camada-a-camada dos cristais de esmalte, que ocorre de maneira centrípeta (Lussi et al., 2011), inicialmente pela bainha prismática, seguida pelo núcleo do prisma. Posteriormente, o ácido não ionizado difunde-se pela região interprismática e dissolve a região sob a superficial superfície. deixando uma camada amolecida. parcialmente desmineralizada (Lussi; Jaeggi, 2008; Eisenburger et al., 2001; Lussi et al., 2011; Buzalaf et al. 2012) (Figura 2.1B). Desafios erosivos frequentes e prolongados ocasionam a progressão da dissolução mineral, podendo levar até à exposição da camada de dentina (Schlueter et al., 2012) (Figura 2.1C).

Figura 2.1 – Diferentes estágios do processo de erosão dental. A: Amolecimento superficial do esmalte (sem perda visível); B: Perda tecidual (desgaste dentário erosivo) e amolecimento da superfície subjacente; C: Perda na dentina (Traduzida de Schlueter et al., 2012)



Clinicamente, as lesões de erosão em esmalte são caracterizadas pela perda de brilho, de contorno e da morfologia da superfície natural (Carvalho et al., 2015). Embora seja difícil desassociar as lesões não cariosas (erosão, atrição, abrasão, abfração) por estarem, na maioria das vezes, associadas (Shellis; Addy, 2014), as lesões de erosão apresentam características peculiares de localização, aparência e

morfologia. As áreas mais frequentemente afetadas são a superfície palatina dos incisivos superiores e a superfície oclusal dos primeiros molares inferiores (Jaeggi; Lussi, 2014).

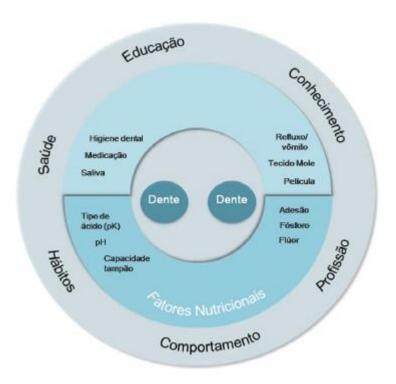
Nas superfícies oclusais, há arredondamento das cúspides, achatamento das estruturas oclusais e as restaurações tornam-se proeminentes, parecendo estar projetadas acima da superfície (Levitch et al., 1994; Lussi et al., 2004, 2011; Lussi; Jaeggi, 2008). Em estágios avançados, a morfologia oclusal pode desaparecer e superfícies escavadas podem se desenvolver (Lussi et al., 2004, 2011; Lussi; Jaeggi, 2008; Carvalho et al., 2015).

Sobre superfícies lisas, os sinais típicos de erosão são o achatamento da superfície e, normalmente, há uma banda de esmalte intacto ao longo da margem gengival (Lussi et al., 2004, 2011; Lussi; Jaeggi, 2008), que pode ser devido a um efeito neutralizante do fluido sucular (Lussi et al., 2004; Featherstone; Lussi, 2006), que tem pH neutro (entre 7,5 e 8,0) (Stephen et al., 1980). Outra hipótese para formação dessa banda, é que algum remanescente de placa bacteriana poderia agir como uma barreira de difusão para os ácidos (Schweizer-Hirt et al., 1978; Lussi et al., 2004). A progressão da lesão leva ao desenvolvimento de concavidades, cuja largura excede claramente a sua profundidade (Lussi; Jaeggi, 2008). Essas lesões ocorrem em dentes permanentes e decíduos, podendo ser localizadas, generalizadas ou assimétrica (Carvalho et al., 2015).

2.2 Patomecanismo e fatores etiológicos da erosão dental

A erosão dental é uma condição multifatorial e tem uma etiologia complexa. Cada fator (químicos, biológicos e comportamentais) desempenha um papel na prevenção ou progressão da lesão por erosão. Ao longo do tempo, a interação de todos estes fatores pode levar a uma progressão ou mesmo proteção da superfície (Lussi et al., 2011). A Figura 2.2 ilustra os diferentes fatores que interferem na formação das lesões de erosão dental.

Figura 2.2 – Interação de diferentes fatores capazes de influenciar o desenvolvimento da erosão dental (Diagrama traduzido de Lussi et al., 2011)



A patogenia da erosão se baseia na dissociação da hidroxiapatita carbonatada do dente (Featherstone; Lussi, 2006). Quando esmalte e dentina são expostos a soluções ácidas, o pH diminui e, assim que um pH crítico para os tecidos duros dentais é atingido, a dissolução mineral se inicia, o que está relacionado ao grau de saturação do meio em relação ao mineral dos dentes. O pH crítico para os tecidos duros dentais é o pH no qual o fluido que circunda a superfície do dente sólido está apenas saturado em relação ao mineral do dente. Considerando a equação da reação reversível de dissociação da hidroxiapatita na saliva (Figura 2.3), quando o pH do fluido que circunda a superfície dental é menor que o pH crítico, há aumento da concentração de íons hidrogênio (H⁺) e diminuição dos íons PO₄⁻³ e OH⁻, ocasionando o deslocamento da equação (Princípio de Le Chatelier), e, por consequência, haverá a desmineralização (Larsen, 1990; Lussi et al., 2011; Ganss et al., 2012a; Lussi; Carvalho, 2015). Diferentemente do que ocorre nas lesões cariosas, o pH crítico para formação das lesões erosivas não é definido (Lussi et al., 2011; Ganss et al., 2012a), porém sabe-se que a dissolução aumenta

exponencialmente em valores de pH abaixo de 3,5 (West et al., 2001; Ganss et al., 2012a; Shellis et al., 2014).

Figura 2.3 – Equação da reação reversível de dissociação da hidroxiapatita na saliva.

Fatores químicos estão comumente relacionados à fonte de ácido. Determinar quais características dos ácidos é mais importante na progressão da dissolução mineral ainda consiste em um desafio, visto que o potencial erosivo destes ácidos não pode ser determinado apenas pelo seu pH, mas também pelo tipo e quantidade, titulação, pKa, capacidade tampão, temperatura, potencial quelante de cálcio, agitação, todos fatores sendo dependentes entre si (West et al., 2001; Wang; Lussi, 2012).

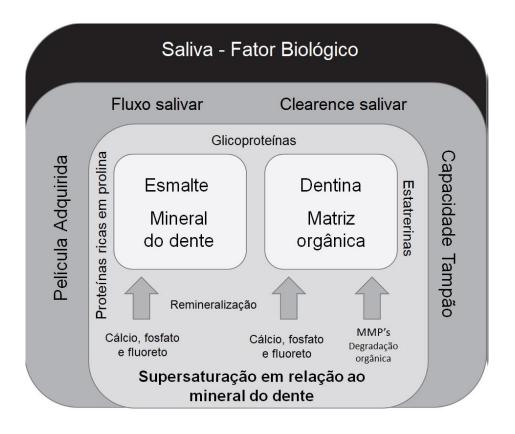
O ácido cítrico é um exemplo de agente quelante, capaz de se ligar aos íons cálcio do esmalte dental, formando compostos mais solúveis - como o citrato de cálcio - e também aos íons cálcio da saliva, reduzindo seu grau de supersaturação em relação aos minerais do dente (Meurman; ten Cate, 1996), o que favorece ainda mais a dissolução dos cristais de hidroxiapatita do esmalte dental (Lussi et al., 2004; Zero; Lussi, 2005).

Os fatores comportamentais são relacionados ao estilo de vida do indivíduo e são os que mais influenciam no desenvolvimento clínico das lesões de erosão, podendo ser considerados fatores modificadores (Zero; Lussi, 2006). São exemplos de fatores que podem exacerbar o desenvolvimento dessas lesões: forma como o líquido é ingerido, tempo de contato dos alimentos com o dente, frequência de ingestão, alcoolismo crônico, desordens alimentares, hábitos de higiene inadequados, consumo excessivo de mediações efervescentes, natação em piscina

com cloro abundante (Levitch et al., 1994; Zero, 1996; Bartlett; Shah, 2006; Lussi, 2006; Lussi; Jaeggi, 2008; Magalhães et al., 2009).

Os fatores biológicos estão relacionados com as características do próprio indivíduo. Dentre eles, estão a composição e anatomia dentais, oclusão, relação entre dentes e tecidos moles e, principalmente, a saliva (Zero, 1996; Moss, 1998; Lussi; Jaeggi, 2008; Lussi et al., 2011). Vários mecanismos de defesa salivares influenciam durante um desafio erosivo, tais como: formação da película adquirida; ação diluente sobre os ácidos; depuração salivar, que gradualmente elimina o agente erosivo da boca através de deglutição; capacidade tampão, que promove a neutralização e tamponamento de ácidos, favorecendo a remineralização; algumas proteínas presentes na saliva e película adquirida, as quais desempenham um papel importante na erosão dental (Eisenburger et al., 2001; Lussi et al., 2004; Van Nieuw Amerongen et al., 2004; Hara et al., 2006; Buzalaf et al., 2012) (Figura 2.4). A interação destes fatores justifica a predisposição de alguns indivíduos para o desenvolvimento da lesão de erosão dental, mesmo que todos sejam expostos aos mesmos desafios ácidos (Lussi, 2006).

Figura 2.4 – Fatores salivares associados ao controle da erosão dentária no esmalte e na dentina. (Diagrama traduzido de Buzalaf et al., 2012)



2.3 A importância da saliva na erosão dental

A saliva desempenha um papel importante na manutenção da saúde bucal no geral e, devido aos vários fatores salivares que contribuem para a proteção das superfícies dos dentes contra os impactos ácidos, tem sido considerada o fator mais importante no processo da erosão dental.

A saliva é secretada por três pares de glândulas salivares maiores (parótida, submandibular e sublingual) e numerosas glândulas salivares menores. É constituída por componentes inorgânicos e orgânicos. Entre os componentes inorgânicos, o bicarbonato é relacionado com a capacidade tampão da saliva, enquanto o cálcio e fosfato determinam o seu grau de saturação (Buzalaf et al., 2012). Quando em níveis adequados, a presença destes compostos inorgânicos na saliva pode promover a sua redeposição sobre o tecido dental e remineralização do tecido desmineralizado (Meurman; ten Cate, 1996; Rios et al., 2006). Além disso, o flúor derivado da saliva e/ou produtos de higiene oral, contribui para formações de complexos ácido-resistentes, que podem favorecer a remineralização de superfícies desmineralizadas.

O nível de bicarbonato na saliva está positivamente relacionado com a taxa de fluxo salivar; portanto, saliva produzida em um baixo fluxo salivar possui um pH mais baixo, uma capacidade tampão reduzida e menor conteúdo mineral salivar (Zero, 1996; Moss, 1998). Além do nível de bicarbonato, o aumento do fluxo salivar promove maior oferta de cálcio e fosfato (Dawes, 1969), que atuam como íons comuns para os minerais no esmalte e dentina, facilitando a deposição mineral e resultando em uma taxa de dissolução mais lenta (Meurman; ten Cate, 1996; Buzalaf et al., 2012). O fluxo salivar age também como fator protetor do tecido dental, devido à diluição dos agentes erosivos e, juntamente com a deglutição, à depuração salivar (Lussi et al., 2004; Buzalaf et al., 2012). Por isso, avaliação da função das glândulas salivares é de grande importância na abordagem da erosão.

A porção orgânica da saliva é basicamente constituída por proteínas e glicoproteínas. Dentre elas, destacam-se as proteínas ricas em prolina (PRPs) (maior conteúdo proteico da saliva produzida pela parótida) e a amilase; em menor quantidade são encontradas as estaterinas, histatinas, mucinas e metaloproteinases de matriz (MMP's) (Dodds et al., 2005; Buzalaf et al., 2012). Elas apresentam um

papel importante na formação da película adquirida. Além disso, as estaterinas permitem que a saliva mantenha seu estado de supersaturação com relação aos sais de cálcio e fosfato, inibindo a precipitação espontânea destes minerais; as histatinas, quando fosforilada, possuem propriedades anti-demineralização (Van Nieuw Amerongen et al., 2004; Buzalaf et al., 2012); a mucina (maior componente da saliva produzida pelas glândulas submandibulares e sublinguais) é um componente importante da película adquirida e possui alto potencial de hidratação, proporcionando lubrificação (Nieuw Amerongen et al., 1987). Já as MMP's, presentes na saliva, no fluido crevicular gengival e na dentina (Ingman et al., 1994; Mäkelä et al., 1994; Sulkala et al., 2001), podem estar relacionadas a uma progressão mais rápida da erosão, por influenciar negativamente a remineralização da dentina desmineralizada (Nordbø et al., 2003). Dessa forma, indivíduos com alta concentração de MMP's na saliva têm maior susceptibilidade à cárie (Chaussain-Miller et al., 2006) e, possivelmente, à erosão dental (Buzalaf et al., 2012).

2.4 Película adquirida e a erosão dental

A película adquirida pode ser definida como uma fina camada acelular (espessura de 10-20 nm) (Hannig, 1999), homogênea e livre de bactérias que se forma sobre tecidos duros e moles após exposição aos fluidos presentes na cavidade bucal (Armstrong, 1968; Buzalaf et al., 2012; Siqueira et al., 2012a). É composta por glicoproteínas, proteínas e enzimas (Hannig et al., 2005b). As estaterinas, histatinas e PRPs também são conhecidas como "proteínas precursoras de película", pois possuem elevada afinidade para a hidroxiapatita e adsorvem à superfície dental rapidamente através de interações eletrostáticas, iniciando o processo de formação da película adquirida (Hay, 1973; Jensen et al., 1992; Lendenmann et al., 2000; Siqueira et al., 2012a). Durante o processo de maturação, outras proteínas interagem com as precursoras e as mucinas auxiliam nessa agregação, até que um equilíbrio entre adsorção e de-sorção de proteínas se estabeleça e resulte em uma película madura, livre de placa e de maior espessura (até 1.000 nm) (Hannig, 1999), o que ocorre em até 2 horas (Lendenmann et al., 2000).

As proteínas que participam da formação da película podem ser divididas nos seguintes grupos: as que têm capacidade de se ligar a íons cálcio (17,5%), as que apresentam uma alta tendência a se ligar a íons fosfato (15,4%) - que podem formar a camada proteica primária que adsorve à superfície do esmalte- e, finalmente, as que podem interagir com outras proteínas (28,2%). Elas são responsáveis pela resposta inflamatória, antimicrobiana, defesa imunológica, lubrificação, capacidade tampão e remineralização, o que torna a película um fator importante relacionado à erosão dental (Buzalaf et al., 2012).

A presença desta camada, que é relativamente resistente à exposição aos ácidos (Hannig; Balz, 1999; Wiegand et al., 2008b), pode auxiliar na proteção das superfícies dentais contra a dissolução ácida devido a sua capacidade de agir como uma barreira de difusão ou uma membrana de permeabilidade seletiva, prevenindo o contato direto do ácido com a superfície dental e reduzindo, assim, a desmineralização (Amaechi et al., 1999; Hannig; Balz, 1999; Hannig et al., 2003; Hara et al., 2006; Buzalaf et al., 2012; Ganss et al., 2012a). Além disso, tem a capacidade de regular a precipitação de minerais sobre a superfície dental (Amaechi et al., 1999; Zahradnik, 1979; Siqueira et al., 2012a), o que inibe a precipitação espontânea de fosfato de cálcio e possibilita que a saliva mantenha-se supersaturada em relação ao mineral dental (Gron; Hay, 1976; Buzalaf et al., 2012; Vukosavljevic et al., 2014). A película promove ainda lubrificação, o que diminui o atrito entre os dentes e a mucosa e, consequentemente, minimiza a abrasão durante a mastigação (Lendenmann et al., 2000; Siqueira et al., 2012a).

Diferenças na composição e espessura da película adquirida podem proporcionar diferentes graus de proteção contra a desmineralização do esmalte dental (Hara et al., 2006; Moazzez et al., 2014; Vukosavljevic et al., 2014). Mais de 100 proteínas de diferentes graus de funcionalidade foram identificadas em películas de esmalte (Siqueira et al., 2007), e a variação na presença ou na quantidade dessas proteínas pode alterar a capacidade da película de atuar como fator protetor na erosão dental (Hannig; Balz, 1999). Estudos sugerem que as superfícies dos dentes com películas mais finas têm uma resistência menor à dissolução mineral em comparação com as superfícies dos dentes com películas mais espessas (Amaechi et al., 1999; Hannig; Balz, 1999; Young; Khan, 2002). É importante considerar ainda que a composição da película difere entre indivíduos, ao longo do tempo (Finke et al., 2002) e dependendo das características da superfície (Vassilakos et al., 1992a).

Após desafios erosivos subsequentes, a película de indivíduos susceptíveis à erosão é alterada, possuindo estaterinas, cálcio e o conteúdo total de proteínas reduzidas, podendo ser um fator de risco que contribui para o desenvolvimento das lesões erosivas (Carpenter et al., 2014; Moazzez et al., 2014; Uhlen et al., 2016).

Considerando a importância da função protetora da saliva e da película adquirida aos tecidos dentais frente a desafios erosivos (Buzalaf et al., 2012), estudos que reproduzam as condições que ocorrem na cavidade oral mostram-se mais verossímeis para a avaliação de fatores que possam interferir na progressão das lesões erosivas (Hove et al., 2008; Wiegand e Attin, 2011). Neste sentido, trabalhos *in situ* têm sido realizados (Ganss et al., 2004, 2010a; Hove et al., 2008; Schlueter et al., 2009a, 2011, 2014; Mathews et al., 2012), visto que, além de permitirem o contato das amostras com o ambiente bucal, possibilitam condições experimentais padronizadas (Wiegand; Attin, 2011) e métodos exatos de análises do substrato dental (Hove et al., 2008; Shellis et al., 2011).

2.5 Prevenção e controle da erosão dental

Com o aumento da prevalência de erosão dental (Jaeggi; Lussi, 2006, 2014; Kreulen et al., 2010; Bartlett et al. 2013; Salas et al., 2015), o desenvolvimento de métodos de prevenção e controle das lesões erosivas é imprescindível.

Para um tratamento efetivo dos pacientes é fundamental um diagnóstico diferencial adequado, considerando as várias formas de desgaste dental, avaliação e identificação de todos os fatores causais relevantes. Para tanto, o exame clínico deve estar ligado a um histórico completo, incluindo condições de saúde gerais, hábitos de higiene bucal, hábitos alimentares, práticas esportivas e ocupacionais (Ganss et al., 2012a; Carvalho et al., 2015). Considerando que a erosão dental é multifatorial, tendo o ácido como causa principal, a controle deste fator impede seu progresso.

Adicionalmente ao controle dos fatores etiológicos, diversas estratégias complementares para proteger as superfícies dos dentes, reduzindo a progressão da desmineralização por erosão, têm sido estudadas (Ganss et al., 2012a). Dentre elas, podem ser citados os fluoretos (Attin et al., 1999; Ganss et al., 2001a, 2004, 2008,

2010a, 2012a; Hove et al., 2006, 2008; Schlueter et al., 2007, 2009a, b, d, e, 2010, 2011; Wiegand et al., 2010a; Yu et al., 2010a, b; Magalhães et al., 2011a; Mathews et al., 2012), soluções antiácidas (Turssi et al., 2012), lasers de alta potência (Wiegand et al., 2010b; Magalhães et al., 2011b; Lepri et al., 2014; Ramos-Oliveira et al., 2014; Scatolin et al., 2015a,b; Ramalho et al., 2019), adesivos (Azzopardi et al., 2004; Sundaram et al., 2007) e selantes (Bartlett et al., 2011). Em casos com grande perda tecidual, restaurações adesivas se fazem necessárias (Schlueter et al., 2012), porém, devem ser associadas com métodos preventivos (Carvalho et al., 2015).

2.5.1 Fluoretos

Estratégias eficazes de prevenção são essenciais em estágios iniciais de erosão, e, dentro desse contexto, o uso de fluoretos tem o papel principal de minimizar a perda mineral do tecido dental, e não na remineralização da camada de esmalte amolecido (Magalhães et al., 2011a). Isso porque, apesar do amolecimento do esmalte ser um processo reversível, e o tecido dental pode ser potencialmente remineralizado. esta camada desmineralizada de esmalte erodido é consideravelmente pequena em comparação com a perda de esmalte, que é irreversível e leva a um desgaste tecidual mais severo devido à maior suscetibilidade dos tecidos desmineralizados e amolecidos à abrasão (Rakhmatullina et al., 2013). Ademais, Carvalho e Lussi (2014) demostraram que após os dentifrícios terem sido utilizados no esmalte erodido, a microdureza superficial aumentava, e esse aumento na dureza era claramente resultado da remoção parcial da camada de esmalte amolecida (erodida) e não da remineralização do esmalte propriamente dita.

Sendo assim, produtos fluoretados que contenham outros componentes que interferem neste processo de desmineralização do esmalte, seja estabelecendo camadas orgânicas protetoras ou precipitando sais minerais resistentes aos ácidos, tornam-se interessantes para serem estudados (Ganss et al., 2012a).

2.5.1.1 Mecanismo de ação dos fluoretos

Apenas após 20 segundos da aplicação de flúor tópico sobre a superfície dental, há deposição de material semelhante a fluoreto de cálcio (CaF_2 -like) (Petzold, 2001; Lussi et al., 2012; Lussi; Carvalho, 2015), sendo que o Ca que é proveniente da saliva e, em parte, do mineral do dente quando soluções fluoretadas levemente ácidas são aplicadas (Saxegaard; Rolla, 1989; Larsen; Richards, 2001). Os íons de fluoreto são, em parte, adsorvidos na superfície cristalina e estão em equilíbrio dinâmico com os íons de flúor do fluido que circunda a superfície do dente, o que leva a um equilíbrio ou supersaturação em relação a flúor (hidroxi) apatita e, portanto, à reprecipitação de minerais.

O precipitado de CaF₂ tem formato de glóbulos esféricos e dificilmente é encontrado puro *in vivo*, pois fosfatos, proteínas e outras substâncias são depositados nele, o que estabiliza o precipitado, tornando-o mais ácido-resistente. Esses precipitados funcionam como um reservatório de íons flúor livre controlado por pH, liberando rapidamente F⁻ quando há queda do pH, e permanecendo estáveis por mais tempo na superfície do esmalte em pHs neutros (Rölla; Ekstrand, 1996; ten Cate, 1997). Para prevenção de cárie dental, isso é muito bem-vindo porque os íons de flúor estão se tornando disponíveis quando o pH da placa diminui (Øgaard, 1990; ten Cate, 1997). Com a erosão, no entanto, é necessária uma cobertura mais resistente aos ácidos e a eficácia do flúor no quadro de proteção contra a erosão é limitada (ten Cate et al., 2003; Wiegand; Attin, 2003; Ganss et al., 2012a).

Os íons F liberados tanto inibem a desmineralização quanto promovem a remineralização (Fejerskov et al., 1981). Estes são posteriormente incorporados no esmalte como hidroxifluorapatita ou fluorapatita, resultando em diminuição da susceptibilidade à dissolução, visto que a dissolução destes minerais ocorre apenas a um pH mais baixo que da hidroxiapatita (± 5,5 para a hidroxiapatita e ± 4,7 para a hidroxifluorapatita e fluorapatita) (ten Cate, 1997). Contudo, tal incorporação de uma pequena quantidade de fluoreto para os componentes minerais (aproximadamente 5%) (Weatherell et al., 1977) do esmalte reduz a solubilidade até determinado limite, sendo a adsorção dos íons flúor na superfície mais eficaz na inibição da desmineralização (ten Cate; Duijsters, 1983; Lussi et al., 2012).

Além de funcionar como um reservatório mineral, a camada de CaF₂ comporta-se como uma barreira física frente à redução significativa de pH que ocorre em desafios ácidos, dificultando o contato do ácido com o esmalte adjacente (Magalhães et al., 2011a; Ganss et al., 2012a). No entanto, para proteger contra desafios erosivos, esta camada deve ser suficientemente densa e estável (Lussi; Carvalho, 2015), o que depende do pH, da concentração de fluoreto e da frequência de aplicação. Quanto maior a frequência de aplicação e a concentração de fluoreto, maior é a precipitação de fluoreto de cálcio (Magalhães et al., 2011a). Agentes fluoretados com pH abaixo de 5,0 induzem maior deposição de CaF₂ do que os com pH neutro (Saxegaard; Rölla, 1988). Entretanto, mesmo sob as melhores condições, a camada de CaF₂-like recobre apenas 40% da superfície do esmalte (Koeser et al., 2014). Há ainda que considerar que, como a saliva é subsaturada em relação ao CaF₂, a camada de CaF₂ existe apenas por um período relativamente breve, sendo que a maior parte já se perdeu apenas algumas horas ou dias após a aplicação do fluoreto (Lussi et al., 2012).

Visto que para o efeito antierosivo de fluoretos convencionais - como fluoreto de sódio (Hove et al., 2008; Levy et al., 2012; Comar et al., 2012; Mathews et al., 2012) e fluoreto de amina (Vieira et al., 2005; Ganss et al., 2010a) – pode haver relação dose-resposta, requerendo um regime de fluoretação intensivo (Ganss et al., 2004) e, ainda assim, com potencial limitado contra a erosão (Lussi; Carvalho, 2015), estudos recentes têm se focado em compostos de fluoretos mais eficazes (Magalhães et al., 2011a; Ganss et al., 2012a; Lussi; Carvalho, 2015). Neste contexto, os compostos contendo íons metálicos polivalentes combinados a fluoretos vêm sendo testados, tais como titânio, estanho, cobre, zinco, alumínio e ferro (Ganss et al., 2012a; Lussi; Carvalho, 2015).

Dentre eles, soluções contendo estanho associado a fluoretos provaram ser muito eficazes na redução da desmineralização por erosão (Ganss et al. 2004, 2008, 2010a,b, 2012b, 2014, 2015; Schlueter et al., 2009a,b,c,d,e, 2010, 2011a, 2013, 2014; Hove et al., 2006, 2008; Wiegand et al., 2009; Yu et al., 2010a,b; Huysmans et al., 2011; Comar et al., 2012; Stenhagen et al., 2013; Rakhmatullina et al., 2013; Carvalho; Lussi, 2014; João-Souza et al., 2017; Ramos-Oliveira et al., 2017; da Silva et al., 2017 a,b; Lussi et al., 2019).

2.5.1.2 Estanho associado a fluoretos

A eficácia do estanho na proteção contra a desmineralização (Rølla; Ellingsen, 1994) é atribuída a sua capacidade de reagir com a superfície do dente (Cooley, 1961; Babcock et al., 1978) e modificá-la (Krutchkoff et al., 1972), e este efeito provavelmente resulta em uma maior resistência à desmineralização (Schlueter et al., 2009d).

Além do fluoreto de cálcio (CaF₂), a reação entre os íons de estanho e o tecido duro dental pode formar sais de Sn₂OHPO₄, Sn₃F₃PO₄, Ca(SnF₃)₂ (Babcock et al., 1978), Sn(OH)₂, Sn₂(PO₄)OH (Hercules; Craig, 1976) ou SnHPO₄ (Nelson; Bainbridge, 1973). Estes resultados variáveis indicam que os sais minerais resultantes são altamente dependentes de fatores como pH, concentração, tempo de aplicação, o composto de flúor e a razão F/Sn (Ganss et al., 2012a).

Os sais provenientes da reação do estanho com a hidroxiapatita se depositam sobre a superfície do dente, formando uma camada amorfa estável (Hove et al., 2006) de aproximadamente 500 nm (Schlueter et al., 2009b), tanto em superfícies de esmalte erodidas, como nas hígidas (Lussi; Carvalho, 2015). Esses depósitos ricos em estanho possuem uma taxa de dissolução muito baixa (Hove et al., 2006), podendo ser reforçados por maior tempo de exposição e aplicações repetidas, e eventualmente, resultar em maior proteção do substrato dental subjacente (Wei, 1974; Khambe et al., 2014; Lussi; Carvalho, 2015; da Silva et al., 2017a,b).

Durante o processo de desmineralização e remineralização há a incorporação destes íons de estanho em até 20 µm de profundidade no esmalte e a formação de uma zona relativamente densa e ampla de esmalte estruturalmente alterado, que é a principal responsável por conferir a notável eficácia das soluções de fluoreto associado à estanho em proteger a superfície de esmalte da desmineralização (Schlueter et al., 2009b). Mesmo após desafios erosivos, a quantidade de estanho retido é alta, mas é limitada pelo fenômeno de saturação (Schlueter et al., 2009b). Isso é relevante para a determinação de concentração dos ingredientes ativos (estanho e fluoreto) para produtos comerciais, visto que o estanho em altas concentrações pode gerar efeitos adversos como sensação adstringente e descoloração dos dentes (Schlueter et al., 2011).

Atualmente, é aceito que o mecanismo de ação dos produtos contendo estanho no esmalte erodido está relacionado à precipitação deste íon na superfície do dente, bem como à eventual incorporação de estanho na camada próxima da superfície do esmalte. No entanto, é importante ressaltar que este efeito está relacionado mais a inibir a progressão da desmineralização próxima da superfície (amolecimento do esmalte) e não em remineralizar o esmalte erodido (Lussi; Carvalho, 2015).

Assim como o fluoreto tem efeito protetor limitado contra a desmineralização erosiva, o estanho sozinho tem capacidade semelhante (Ganss et al., 2008; Lussi; Carvalho, 2015). No entanto, quando associados (tanto o SnF₂ quanto AmF/SnCl₂), a inibição da perda mineral é significativamente maior (Schlueter et al., 2009e, 2010).

Schlueter e colaboradores (2009a) foram os primeiros a propor uma fórmula de apresentação comercial para as soluções à base de AmF/NaF/SnCl₂ (Elmex Erosion Protection®, GABA, Therwi, Suíça), contendo 500 ppm de F⁻ e 800 ppm de Sn²⁺. O produto proporciona uma redução da perda mineral em esmalte entre 65 e 73%, mesmo diante de condições severas de erosão, sem apresentar reações adversas, sugerindo sua indicação não somente para pacientes de alto risco, mas também em pacientes com sinais clínicos iniciais de perda de substrato dental (Schlueter et al., 2009a, 2011; Ganss et al., 2010a). Diversos estudos *in vitro* (Gracia et al., 2010; Yu et al., 2010a,b; Rakhmatullina et al., 2013; Carvalho; Lussi, 2014; da Silva et al., 2017a) e *in situ* (Schlueter et al., 2009a; 2011; Ramos-Oliveira et al., 2017; da Silva et al., 2017b) confirmaram o potencial antierosivo desta solução.

Essa associação, que utiliza o SnCl₂ e AmF/NaF como fonte independente de estanho e fluoreto, permite que a eficácia dessa solução seja otimizada ao dispor a taxa mais efetiva entre o fluoreto e o estanho (Schuleter et al., 2009a). Nessas soluções, o fluoreto de amina é necessário devido às suas propriedades estabilizadoras (Mühlemann; Saxer, 1981), visto que soluções com íons de estanho em altas concentrações são instáveis em pH 4,5 e tendem a formar precipitados (Schuleter et al., 2009a). O estanho inorgânico não apresenta toxicidade sistêmica, sua absorção pelo trato gastrointestinal é muito limitada e é rapidamente eliminado, sendo seguro para uso como enxaguatório bucal (European Food Safety Authority, 2005).

2.6 Compostos fluoretados e a película adquirida

Apesar da solução de AmF/NaF/SnCl₂ atualmente ser considerada "padrãoouro" para controle e prevenção de erosão dental (Ganss et al., 2010a; Rakhmatullina et al., 2013), deve-se ter em mente que a erosão é altamente influenciada por fatores biológicos, especialmente pela película dental adquirida e os componentes salivares (Hara et al., 2006, 2013), e pouco se sabe sobre como esses fatores interferem na interação dos compostos fluoretados associados ao estanho com o substrato dental.

Sabe-se que a película se forma nas superfícies dentárias imediatamente após o contato com a saliva ou outras fontes proteicas, conferindo proteção ao esmalte contra ataques ácidos, mesmo em estágios muito iniciais de maturação (Hannig, 1999; Hannig et al., 2004). A película pode ainda ser interrompida intermitentemente e alterada por desafios erosivos e abrasivos (Skjørland et al., 1995), e estes processos podem incluir a exposição a produtos de cuidados orais contendo íons de estanho durante a higiene bucal (Hara et al., 2013).

Considerando que a película adquirida tem a capacidade de regular a precipitação de minerais sobre a superfície dental (Zahradnik, 1979; Siqueira et al., 2012a), por agir como uma barreira de difusão ou membrana de permeabilidade seletiva, interferindo no transporte iônico e na precipitação de íons na superfície (Zahradnik et al., 1976; Hannig; Balz, 1999; Hara et al., 2006; Buzalaf et al., 2012), é possível que ela interfira também na deposição de sais e na incorporação de íons de estanho à superfície. Essa propriedade de permi-seletividade aumenta com o tempo de maturação da película (Zahradnik, 1979). De acordo com alguns autores (Zahradnik; Moreno, 1977; Hannig; Balz, 1999), além da maturação, a composição proteica da película adquirida também influencia a sua característica de seletividade por modificar a interação química com os precipitados. Estudos sugerem que os precipitados de CaF2 e Sn são mais estáveis e conferem maior proteção na presença de película adquirida (Ganss et al., 2007; Hove et al., 2007; Khambe et al., 2014); isso porque as proteínas da película poderiam influenciar a formação e estabilização dos precipitados de CaF₂ e Sn formados na superfície do esmalte após a exposição ao flúor, devido à adsorção de fosfatos e proteínas, aumentando a eficácia do tratamento com flúor (Rykke et al., 1989; Algarni et al., 2015).

Embora informações sobre os efeitos do flúor na formação da película sejam limitadas (Siqueira et al., 2012b), alguns estudos sugerem que a película adquirida pode interagir com o flúor e o estanho, modificando seus efeitos protetores contra a desmineralização (Sönju; Rölla, 1973; Siqueira et al., 2012b). Enxaguatórios bucais com flúor e estanho podem modular a formação da película (Siqueira et al., 2012b), modificando a quantidade e a composição das proteínas da película acumuladas na superfície do esmalte. Maior quantidade de proteínas na película tratada com o fluoreto estanhoso, dentre elas as proteínas já relacionadas com as propriedades protetoras da película para o substrato dental frente a desafios erosivos (Siqueira et al., 2012a; Algarni et al., 2015), é reportada, o que pode levar ao fortalecimento da resistência ácida da película (Kensche et al., 2017, 2019). Essa maior quantidade de proteínas encontradas após o tratamento com Sn+F, sugere que essa associação pode favorecer a interligação entre as proteínas da película (Veeregowda et al., 2011; Algarni el al., 2015).

2.7 Momento da aplicação das soluções fluoretadas

Além da composição, a capacidade protetora da película é regulada por fatores como a sua espessura e maturação (Hove et al., 2007), podendo ser afetada também pela natureza do desafio erosivo, tais como tempo de exposição (Hara et al., 2006), tipo (West et al., 2000; Hannig et al., 2005a) e concentração do ácido (West et al., 2000; Nekrashevych; Stösser, 2003). Esta proteção é limitada a desafios erosivos mais leves (Hara et al., 2006); já em ciclagens mais agressivas, as proteínas adsorvidas na superfície do esmalte podem ser parcialmente removidas restando uma camada basal não inteiramente madura (Bennick et al., 1983; Nieuw-Amerongen et al., 1987; Hannig et al., 2005a; Hove et al., 2007), visto que, em condições de baixo pH, as fortes ligações aniônicas entre as proteínas e a superfície do esmalte são enfraquecidas (Hara et al., 2006). Sendo assim, a película adquirida presente em um substrato que foi submetido a diversos desafios erosivos subsequentes é diferente da encontrada previamente aos desafios, o que pode influenciar no seu fator protetor e na sua interação com os precipitados dos

compostos fluoretados. Nesta perspectiva, é possível que o momento no qual os compostos fluoretados são aplicados possa influenciar sua efetividade.

A aplicação das soluções fluoretadas, em especial as contendo estanho, previamente à formação da película, pode levar a modulações na formação e alterações ultraestruturais e nas propriedades físico-químicas da película in situ, sendo capaz de aumentar sua capacidade protetora frente a desafios ácidos (Siqueira et al., 2012b; Kensche et al., 2017, 2019). Isto ocorre, pois, como o tratamento com flúor provoca alterações químicas na superfície do esmalte pela deposição de sais de CaF₂ e outros compostos derivados do estanho, e a formação da película é baseada na adsorção seletiva de proteínas salivares na superfície do esmalte, a superfície da hidroxiapatita alterada pelo tratamento com flúor altera também o perfil de proteínas adsorvidas. Além da maior quantidade de proteínas, Siqueira et al. (2012b), observou, no esmalte tratado com flúor em alta concentração, a ausência da PRP's ácidas, que são potenciais inibidoras da precipitação secundária de fosfato de cálcio, o que poderia sugerir que o tratamento com flúor favorece a remineralização. Considerando ainda que a película formada após desafios erosivos sucessivos tem a quantidade de proteínas reduzida (Carpenter et al., 2014; Moazzez et al., 2014; Uhlen et al., 2016), a aplicação dos enxaguatórios bucais logo após o desafio erosivo poderia levar à remodelação de uma película adquirida menos susceptível à desmineralização e mais propensa à remineralização, mesmo que esta seja limitada no contexto de erosão dental.

Entretanto, O'Toole e colaboradores (2015) observaram que a aplicação da solução de AmF/NaF/SnCl₂ mostrou reduzir a perda mineral quando feita antes do desafio erosivo. Esse resultado pode ser explicado pelo mecanismo de ação dos compostos contendo estanho, que se baseia na deposição dos sais na superfície, formando uma camada amorfa ácido-resistente, o que poderia propiciar maior proteção contra a desmineralização subsequente, além de favorecer a formação da zona de esmalte estruturalmente alterado pela posterior incorporação do estanho na subsuperfície do esmalte. Essa zona é ocasionada por um processo contínuo em que íons H⁺ se difundem através da zona de superfície menos densa, mas mais insolúvel, rica em estanho, induzindo a dissolução e a redeposição de sais minerais contendo estanho em áreas mais profundas (Schlueter et al., 2009b; Ganss et al., 2010b). Pode-se ainda especular que o mineral sólido em grandes quantidades é

necessário para este processo (Ganss et al., 2010b), o que seria favorecido pela aplicação da solução antes da desmineralização.

Estudos recentes buscam uma padronização procedimentos nos experimentais a fim de simular as condições que ocorrem na cavidade bucal durante os desafios erosivos (Wiegand; Attin, 2011). Baseado no conhecimento de todos os fatores envolvidos no processo de erosão dental (hábitos do indivíduo, substrato dental, saliva, etc), estudos in situ se mostram mais adequados devido à aproximação com as condições fundamentais para o surgimento de lesões de erosão sem afetar a dentição natural (Wiegand; Attin, 2011). Apesar dos resultados promissores da solução de AmF/NaF/SnCl2 em reduzir consideravelmente a desmineralização erosiva, deve-se ter em mente que a erosão é altamente influenciada por fatores biológicos, especialmente pela película adquirida e os componentes salivares (Hara et al., 2006, 2013), e pouco se sabe sobre como esses fatores interferem na interação dos compostos fluoretados associados ao estanho com o substrato dental. Neste contexto, estudos que almejem avaliar os diferentes aspectos que poderiam modificar e até aprimorar a eficácia dos tratamentos, com vistas a sua aplicação clínica, são fundamentais.

3 PROPOSIÇÃO E HIPÓTESES NULAS

Este estudo teve como objetivo avaliar:

- Se a variação da concentração do ácido, da frequência e duração das imersões erosivas influenciam na dimensão da perda de tecido dental;
- Se a película adquirida formada in situ interfere na eficácia da solução de AmF/NaF/SnCl₂ na prevenção do esmalte dental humano frente a desafios erosivos;
- Se o momento da aplicação desta solução influencia na sua eficácia.

As hipóteses nulas testadas são:

- Não há diferença na dimensão da perda de tecido dental à variação da concentração do ácido, frequência e duração das imersões erosivas;
- 2. A película adquirida não interfere na eficácia da solução de AmF/NaF/SnCl₂ no controle da progressão da erosão dental;
- O momento da aplicação da solução de AmF/NaF/SnCl₂ não influencia o potencial antierosivo desta solução.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Aspectos éticos

Foram utilizados 104 terceiros molares humanos recém extraídos, cedidos pelo Biobanco de Dentes Humanos da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (FOUSP) e com a concordância do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP-FOUSP) da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo. Trinta e dois dentes foram utilizados para a etapa *in vitro* (parecer nº 1.556.090) (ANEXO A) e setenta e dois para a etapa *in situ* (parecer nº 1.556.128) (ANEXO B).

Na etapa *in situ*, cada participante da pesquisa foi informado dos objetivos e metodologia do estudo, benefícios e possíveis riscos envolvidos no experimento e da confidencialidade dos dados. Todas as informações estavam presentes no Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Resolução no. 466 do Conselho Nacional de Saúde, Ministério da Saúde, Distrito Federal, Brasil, 12/12/2012), os quais foram assinados em duas vias, pertencendo uma ao participante da pesquisa, e outra aos pesquisadores (APÊNDICE A).

4.2 Etapa in vitro

4.2.1 Delineamento experimental in vitro

Na etapa *in vitro* foram utilizadas 64 fragmentos de esmalte dental humano, com a finalidade de determinar a ciclagem erosiva a ser utilizada na etapa *in situ*, visando obter um protocolo simplificado de formação da lesão erosiva, que mantivesse um padrão de lesão avançada, correspondente a indivíduos com alto risco de erosão dental.

As amostras foram randomicamente divididas em 8 grupos experimentais (n=8), de acordo com a ciclagem proposta: G1 – ácido cítrico 0,5%, 3x/dia, 2 min; G2 - ácido cítrico 0,5%, 6x/dia, 2 min; G3 – ácido cítrico 0,5%, 3x/dia, 5 min; G4 - ácido cítrico 0,5%, 6x/dia, 5 min; G5 – ácido cítrico 1%, 3x/dia, 2 min; G6 - ácido cítrico 1%, 6x/dia, 2 min; G7 – ácido cítrico 1%, 3x/dia, 5 min; G8 - ácido cítrico 1%, 6x/dia, 5 min.

Concluída a fase experimental, foi realizada a análise quantitativa da perda de tecido mineral (em µm) por meio de perfilometria óptica.

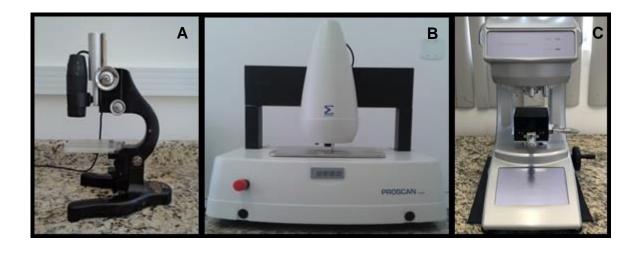
4.2.2 Obtenção dos dentes e preparos das amostras

Foram necessários 32 terceiros molares humanos recém extraídos, hígidos, cedidos pelo Biobanco de Dentes Humanos da FOUSP, os quais foram submetidos a uma profilaxia com pedra-pomes e água, com auxílio de uma escova de Robinson em baixa rotação. As coroas foram seccionadas em máquina de corte de alta precisão (Isomet 1000, Buehler Ltd, Lake Buff, Illinois, EUA) e das faces lisas foram obtidos 2 fragmentos quadrangulares de esmalte com dimensões aproximadas de 3,0 mm de altura, 3,0 mm de comprimento e 1,0 mm de espessura. Em seguida, as superfícies do espécime foram polidas com lixa de carbeto de silício com granulação de #800, #1200, #4000, seguido do polimento com disco de feltro com pasta de Alumina em suspensão de granulometria 0,3 µm (Buehler Ltd, Lake Buff, Illinois, EUA - Padrão FEPA), com o objetivo de obter superfícies planas, paralelas e polidas. Entre cada série de polimento, os espécimes foram lavados em água destilada-deionizada por 8 minutos em cuba-ultrassônica (Kondortech®, São Carlos, SP, Brasil). As amostras foram incluídas em resina acrílica (Buehler Ltd, Lake Buff, Illinois, EUA – Padrão FEPA) com auxílio de matrizes quadrangulares previamente à sequência de polimento.

4.2.3 Seleção das amostras de esmalte

Todos os espécimes obtidos foram observados em lupa estereoscópica (Figura 4.1A) com magnificação de 40 vezes para verificar a existência de defeitos e trincas no esmalte dental. Os espécimes foram levados ao perfilômetro óptico (PROSCAN 2100 3D, Scantron, Taunton, Reino Unido) (Figura 4.1B) para determinação da curvatura da superfície no início da fase experimental, e foram selecionadas as amostras que apresentarem valores até 0,3 µm (Eisenburger et al., 2003). As amostras selecionadas na perfilometria tiveram sua microdureza superficial mensurada (baseline), a fim de selecionar a dureza do substrato obtido após a sequência de polimento. Para tanto, foi utilizado um microdurômetro (HMV-G, Shimadzu Corporation, Tokyo, Japão) (Figura 4.1C), com penetrador Knoop, com carga estática de 50 g aplicada durante 20 segundos (Featherstone, 1992), sendo realizadas três endentações, a 100 µm de distância uma da outra. As médias dos valores de dureza foram consideradas para a seleção das amostras, sendo excluídas do estudo todas as amostras que tiveram um valor médio de microdureza 10% acima ou 10% abaixo da média (320 kg/mm² ± 10%) de todos os fragmentos obtidos. A partir destes dados, foram selecionadas as 64 amostras, que foram randomicamente distribuídas nos grupos experimentais de acordo com a microdureza superficial. Foi realizado um teste de Anova 1-fator que constatou a homogeneidade da distribuição das amostras no baseline (p > 0,05).

Figura 4.1 – Seleção das amostras. A: Lupa Estereoscópica; B: Perfilômetro Óptico; C: Microdurômetro



4.2.4 Delimitação da área de estudo

Para o teste de perfilometria, duas fitas adesivas de cloreto de polivinil não plastificada (UPVC tapes - Graphic Tape; Chartpak, Leeds, EUA) foram aplicadas na superfície de cada amostra de esmalte, deixando exposta uma janela central de aproximadamente 3,0 mm de comprimento x 1,0 mm de largura, para delimitação da área de estudo (Mathews et al., 2012). Por fim, todos os espécimes foram armazenados em umidade relativa a 5°C até o início da fase experimental.

4.2.5 Ciclagem erosiva in vitro

Durante um período de cinco dias, as amostras foram submetidas a procedimentos cíclicos, alternando desafios ácidos e armazenamentos em solução supersaturada em relação ao cálcio e ao fosfato (Gerrard; Winter, 1986; Schlueter et al., 2009b) (Tabela 4.1).

Tabela 4.1 - Descrição das soluções de ciclagem in vitro

Solução	Composição	рН
Desmineralizadora	Ácido cítrico monohidratado	2,3
Supersaturada	$4,08 \text{ mM H}_3\text{PO}_4, 11,90 \text{ mM NaHCO}_3,$ $20,10 \text{ mM KCl e } 1,98 \text{ mM CaCl}_2$	7,0

Os desafios erosivos foram realizados de acordo com o grupo experimental, variando de 3 (G1, G3, G5 e G7) ou 6 (G2, G4, G6 e G8) imersões diárias das amostras em solução de ácido cítrico a 0,5% (G1, G2, G3 e G4) ou 1,0% (G5, G6, G7 e G8), durante 2 (G1, G2, G5 e G6) ou 5 (G3, G4, G7 e G8) minutos cada, com intervalos de 1,5 h entre elas, em temperatura ambiente, sob constante agitação (35 rpm). As amostras foram imersas individual e simultaneamente em recipientes contendo 4 mL de solução ácida. As soluções de ácido cítrico foram renovadas a cada novo desafio. Após cada desafio erosivo, as amostras foram lavadas em água

destilada por 30 segundos e armazenadas na solução supersaturada até o próximo desafio. Durante a noite, as amostras também permaneceram imersas em solução supersaturada, que era trocada no início e no fim de cada ciclo diário (Schlueter et al., 2009b).

4.2.6 Análise Perfilométrica

A análise perfilométrica foi realizada em um perfilômetro 3D (PROSCAN 2100 3D, Scantron, Taunton, Reino Unido), considerando as superfícies de esmalte hígido (preservadas pela fita de UPVC) como referência. Após a remoção da fita, o sensor do aparelho foi programado para escanear uma área central da amostra de 2 mm de comprimento (no eixo X) por 1 mm de largura (eixo Y) no centro da amostra, que corresponde à área tratada e às superfícies de referências de ambos os lados. O aparelho foi ajustado de forma a percorrer 200 passos, com um tamanho de 0,01 mm, no eixo X, e 10 passos de 0,1 mm, no eixo Y. A profundidade da lesão (3-pt step height) foi calculada por um software específico (ProscanApplication software version 2,0,17), com base na subtração da média da altura da área teste, em relação à média da altura das superfícies de referência.

Todas as amostras foram analisadas em perfilômetro óptico duas vezes durante o experimento. Inicialmente, todas passaram pela análise de curvatura (baseline). A segunda varredura ocorreu ao final do 5º dia de ciclagem erosiva para avaliação dos tratamentos. As amostras foram mantidas em umidade relativa até o momento da leitura a fim de se evitar a formação de trincas no esmalte. Imediatamente antes da análise, as amostras foram secas cuidadosamente com o auxílio de um papel absorvente.

4.3 Etapa in situ

4.3.1 Delineamento experimental *in situ* cruzado

A etapa é um estudo *in situ*, duplo-cego, aleatorizado, de três fases com um modelo de *cross-over* e *split-mouth*, concebido de acordo com as orientações do CONSORT e inclui um período observacional total de 3 semanas × 5 dias.

As unidades experimentais foram compostas por 144 fragmentos de esmalte dental humano, randomicamente alocadas em 6 grupos experimentais (n=12): G1 – sem tratamento, com presença de película adquirida; G2 – sem tratamento, sem película adquirida; G3 – Aplicação da solução de AmF/NaF/SnCl₂ previamente à 1ª imersão ácida diária, com presença de película adquirida; G4 - Aplicação da solução de AmF/NaF/SnCl₂ previamente à 1ª imersão ácida diária, sem película adquirida; G5 – Aplicação da solução de AmF/NaF/SnCl₂ logo após a 1ª imersão ácida diária, com presença de película adquirida; G6 - Aplicação da solução de AmF/NaF/SnCl₂ logo após a 1ª imersão ácida diária, sem película adquirida. Sendo consideradas como variáveis independentes "Tipo de Tratamento" e "Película Adquirida"

Os 12 voluntários foram divididos aleatoriamente em seis grupos de tratamentos de 05 dias cada, e utilizaram um dispositivo removível inferior bilateral (*split-mouth*), posicionado na região vestibular de pré-molares e molares, contendo 02 fragmentos de esmalte dental humano (duplicata), dos quais foi obtida uma média dos valores de perfilometria para análise estatística.

Para que não houvesse influência de possível efeito residual dos tratamentos, um período de *wash-out* de 10 dias entre os tratamentos foi incluído. Por utilizar um modelo *cross-over*, ao final do experimento, todos os participantes da pesquisa foram submetidos a todos os tratamentos, cuja sequência foi definida por sorteio aleatório.

A variável de resposta foi a perda superficial de tecido mineral (em μm), analisada de forma quantitativa, por meio de teste de perfilometria óptica.

4.3.2 Obtenção dos dentes e preparos das amostras

Foram utilizados 72 terceiros molares humanos recém extraídos, hígidos, os quais foram limpos e as coroas seccionadas. Os fragmentos de esmalte de aproximadamente 3,0 mm X 3,0 mm X 1,5 mm, obtidos a partir das faces lisas, foram polidos com o objetivo de obter superfícies planas, paralelas e polidas (ver item 4.2.2).

4.3.3 Seleção das amostras de esmalte

Dos 160 fragmentos de esmalte dental humano obtidos, 144 foram selecionados para o estudo *in situ* através de observação em lupa estereoscópica, análise de curvatura por perfilometria e determinação da dureza superficial, da mesma maneira como descrito no item 4.2.3. Por fim, todos foram armazenados em água destilada em geladeira a 5 °C até o início da fase experimental.

4.3.4 Delimitação da área de estudo

A área de estudo dos fragmentos selecionados foi delimitada com auxílio de duas tiras de uma fita de UPVC, deixando exposta uma janela central de aproximadamente 3,0 mm de comprimento x 0,75 mm de largura (Mathews et al., 2012) (Figura 4.2).

Figura 4.2 – Amostra de esmalte humano com área delimitada



4.3.5 Esterilização das amostras

As amostras foram esterilizadas com radiação gama (Wegehaupt et al., 2012), cuja fonte de irradiação consiste de um irradiador de Cobalto-60, modelo Gamacell 220, com 25kGy de dose, pertencente ao Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN (São Paulo, SP, Brasil) (Figura 4.3).

Figura 4.3 – Irradiador de radiação gama tipo Gammacell (IPEN-USP)



4.3.6 Cálculo amostral

O cálculo amostral foi realizado no programa G*Power 3.1.9.4, adotando-se o modelo de análise de variância a dois critérios para blocos casualizados. Para o tamanho de efeito de 0,753, obtido a partir dos dados do estudo piloto realizado com quatro sujeitos, nível de significância de 5% e poder de 80%, o cálculo amostral indicou a necessidade de que no presente estudo houvesse 12 participantes.

4.3.7 Seleção dos participantes da pesquisa

Foram considerados os critérios de inclusão e exclusão dos participantes da pesquisa de acordo com a Tabela 4.2.

Tabela 4.2. Critérios de inclusão e exclusão dos sujeitos da pesquisa

Critérios de inclusão	Critérios de exclusão	
	Presença de patologia sistêmica	
Idade entre 18 e 40 anos	(principalmente doenças associadas à	
	erosão dental)	
Presença de dentição saudável (sem		
atividade de cárie, ausência de lesões		
cervicais não cariosas e ausência de	Grávidas ou lactantes	
doença periodontal) ou suficientemente		
restaurada		
Residir na área urbana do município de	Apresentar alergia a produtos de higiene	
São Paulo	oral	
	Estar fazendo uso medicamentos que	
	interferem no fluxo salivar	
	Estar sob tratamento ortodôntico (usar	
	dispositivo ortodôntico) e próteses fixas	
	ou removíveis	
	Fazer uso sistemático de tabaco e	
	bebidas alcoólicas	

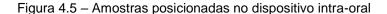
4.3.8 Preparo dos dispositivos intraorais

Para a realização do estudo *in situ*, os 12 participantes da pesquisa tiveram suas arcadas inferiores moldadas com silicone de condensação de consistência pesada (Clonage®, DFL, Jacarepaguá, RJ, Brasil). A partir dos moldes foram obtidos modelos de gesso (Herostone®, Vigodent, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) nos quais foram confeccionados dispositivos inferiores intraorais em resina acrílica. Nichos com altura e largura de aproximadamente 4,0 mm e profundidade de 2,0 mm foram confeccionados nos dispositivos na porção vestibular das regiões de pré-

molares e molares (Olley et al., 2012; Seong et al., 2013) (Figura 4.4). Os dispositivos foram higienizados em ultrassom com 5,0 mL de detergente aniônico para 1,0 L de água destilada para remoção de possíveis resíduos provenientes da fase de confecção e em seguida imersos em clorexidina 0,2% para descontaminação. Foram fixadas, com auxílio de cera pegajosa (Asfer Indústria Química Ltda, São Paulo, Brasil), duas amostras em cada lado do dispositivo, que foram trocadas a cada fase experimental (Figura 4.5). As superfícies das amostras foram posicionadas recuadas em relação aos limites dos nichos para evitar a abrasão pela mucosa jugal (Figura 4.6). Os participantes da pesquisa receberam orientações por escrito quanto ao uso do dispositivo e os procedimentos experimentais que seriam realizados.



Figura 4.4 – Dispositivo intra-oral bilateral



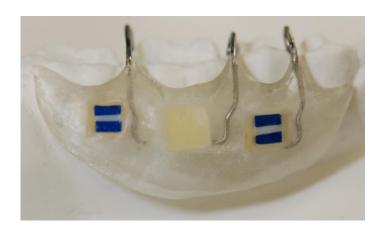


Figura 4.6 – Amostra posicionada recuada em relação ao limite do nicho



4.3.9 Remoção da película adquirida

Nos grupos G2, G4 e G6 a película adquirida foi removida com 2% SDS (Dodecil Sulfato de Sódio - Sigma–Aldrich, Estocolmo, Suécia) (Carlén et al., 1998; Hannig et al., 2005a; Svendsen et al., 2008) no início do ciclo erosivo diário (G2) ou imediatamente antes da aplicação da solução de flúor (G4 e G6).

4.3.10 Tratamento de superfície – solução de AmF/NaF/SnCl₂ (G3, G4, G5 e G6)

Com o dispositivo em boca, os participantes da pesquisa fizeram bochecho com 15 mL da solução de AmF/NaF/SnCl₂ (800 ppm Sn²⁺, 500 ppm F⁻, pH = 4,5, Elmex® Erosion Protection, GABA Int. AG, Switzerland), por 30 segundos. Os tratamentos foram realizados em horários pré-determinados, previamente (G3 e G4) ou logo após (G5 e G6) a primeira imersão diária em ácido cítrico.

4.3.11 Desafio erosivo in situ

O estudo utilizou um desenho cruzado (*cross-over*) e boca dividida (*split-mouth*), com seis fases de tratamento de 5 dias cada, para os quais cada participante da pesquisa foi randomicamente designado, incluindo um período de *wash-out* de 10 dias antes de cada ciclo, totalizando 5 semanas de fase experimental. Os dispositivos intraorais foram utilizados durante o dia, por um período de 8 horas, os quais eram removidos somente enquanto os desafios erosivos extraorais estavam sendo realizados, e durante as refeições e procedimentos de higiene bucal. Durante esses períodos e durante a noite, os dipositivos eram armazenados sob umidade relativa em recipientes plásticos fechados (Schulueter et al., 2009). Após as refeições ou bebidas, os participantes da pesquisa deveriam aguardar 15 minutos antes da reinserção do dispositivo.

No início de cada dia, os participantes da pesquisa foram orientados a aguardar 2 horas com o dispositivo intraoral na boca para formação da película adquirida. (Lendenmann et al., 2000; Hove et al., 2008). Depois disso, nos grupos sem tratamento, a película foi mantida (G1) ou removida (G2), seguida de 4 imersões extraorais em ácido cítrico (Figura 4.7). Nos grupos com aplicação da solução de estanho, esta foi realizada 30 minutos antes (G3 e G4) (Figura 4.8) ou 30 min (G5 e G6) após (Figura 4.9) a primeira imersão diária em ácido cítrico, sendo a película adquirida mantida (G3 e G5) ou removida imediatamente antes do bochecho (G4 e G6). Após o tratamento de superfície, os dispositivos foram usados por um período de 30 min e os desafios erosivos restantes foram realizados.

A ciclagem erosiva diária consistiu em imersão extraoral dos dispositivos em 20 mL de ácido cítrico a 1,0% (pH 2,3, ácido cítrico mono-hidrato, Merck, Darmstadt, Alemanha) durante 5 min, 4 vezes por dia, durante 5 dias. A imersão extraoral teve como objetivo aumentar a padronização do experimento e evitar o contato dos dentes naturais com a solução ácida (Wiegand; Attin, 2011). Após cada imersão em solução ácida, o dispositivo foi cuidadosamente seco com papel absorvente e imediatamente reinserido na boca. A solução ácida foi renovada após cada imersão. Entre cada desafio erosivo, os dispositivos foram utilizados por aproximadamente 1,5 h.

Figura 4.7 – Ciclagem erosiva realizada nos grupos G1 e G2

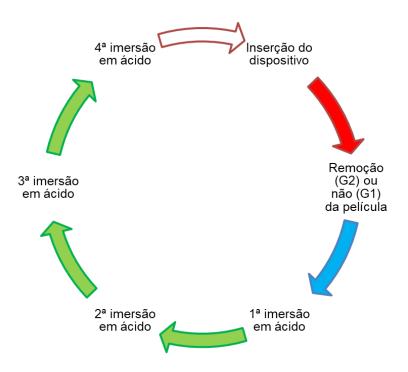
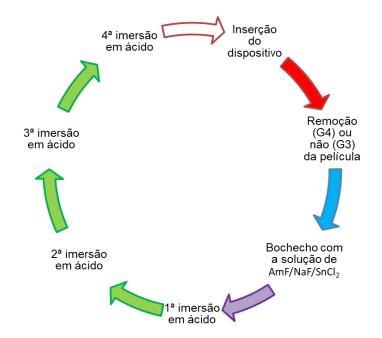


Figura 4.8 - Ciclagem erosiva realizada nos grupos G3 e G4



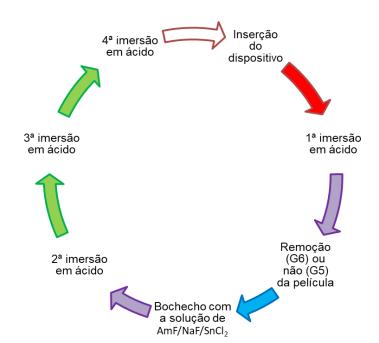


Figura 4.9 – Ciclagem erosiva realizada nos grupos G5 e G6

Higiene oral individual foi realizada com creme dental fluoretado (Colgate Máxima Proteção Anti-Cáries ® com 1.500 ppm F-, Colgate-Palmolive, Osasco, SP, Brasil), escova dental e fio dental (Colgate-Palmolive, Osasco, SP, Brasil). Todos os itens foram fornecidos pelo pesquisador. O objetivo da doação desses materiais foi padronizar todos os participantes da pesquisa, que se comprometeram a usar somente esses produtos fornecidos pela pesquisadora durante o período do experimento, sendo vedada a utilização de bochechos e outros produtos de higiene bucal.

Os participantes foram treinados em relação a todos os procedimentos (em especial, os processos de imersão nas soluções, a limpeza dos dispositivos intraorais e procedimento de secagem com papel absorvente após desmineralização), foram instruídos a não consumir alimentos ácidos durante o estudo, e receberam um protocolo escrito (APÊNDICE A) e um cronograma semanal (APÊNDICE B).

4.3.12 Análise perfilométrica

Ao final de cada fase experimental, as amostras foram removidas cuidadosamente do dispositivo intraoral, as fitas para delimitação da área de estudo foram removidas (Figura 4.10) e as amostras foram levadas ao perfilômetro óptico para análise do perfil da lesão. A análise perfilométrica foi realizada da mesma maneira já descrita no item 4.2.6.

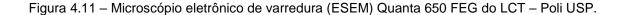
Figura 4.10 – Amostra com lesão erosiva formada in situ, após a remoção das fitas de UPVC



4.3.13 Microscopia Eletrônica de Varredura

A fim de se observar as características de superfície do esmalte, após a ciclagem erosiva *in situ*, 03 amostras representativas de cada grupo, selecionadas aleatoriamente, foram analisadas através de Microscopia Eletrônica de Varredura de alta resolução, em corte transversal. As amostras foram desidratadas em concentrações crescentes de álcool (30%, 50%, 70%, 90%, 95%, 100%), secas com hexametildisilazano (HMDS) por 10 min e secas ao ar em temperatura ambiente em incubadora por 24 h. Após a montagem em *stubs* e revestimento por pulverização com carbono (MED 010, Balzers, BAL-TEC, Liechtenstein), cada amostra foi observada no Microscópio eletrônico de varredura FEI (QUANTA FEG 650, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA), localizado no Laboratório de Caracterização Tecnológica do Departamento de Engenharia de Minas e de Petróleo

da Escola Politécnica da Universidade de São Paulo (Figura 4,11), operando a 15 kV com aumento de 1.500x.





4.4 Análise estatística

4.4.1 Análise estatística da etapa in vitro

Os dados obtidos na análise perfilométrica foram testados no SigmaPlot quanto à distribuição normal e homogênea. Foi utilizada Análise de Variância (ANOVA) 1 fator para medir a diferença entre os grupos, com relação à medida da lesão final. Quando houve diferença estatística entre os grupos, foram utilizadas as comparações múltiplas pelo método de Tukey, ao nível de significância de 5%.

4.4.2 Análise estatística da etapa in situ

Todos os participantes completaram o estudo *in situ* e nenhuma amostra foi perdida. Para cada participante do estudo *in situ*, foi calculada a média da perda das duas amostras (duplicata) por fase experimental, e o fator "voluntário" foi considerado para a análise.

Os dados foram avaliados quanto à homocedasticidade e à distribuição normal e, então, submetidos à análise de variância a dois critérios para blocos casualizados. Para as comparações múltiplas empregou-se o teste de Tukey. O software utilizado foi o SPSS 23 (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA), tendo sido adotado o nível de significância de 5%.

5 RESULTADOS

5.1 Resultados da etapa in vitro

O grupo G8 foi excluído por gerar uma perda de substrato excessiva (45,09 ± 2,06). Nos grupos restantes, houve diferença estatisticamente significante entre os grupos experimentais (p<0,01), e os testes de comparações múltiplas demonstraram diferenças entre eles, sendo válida a expressão G4>G7>G6>G2=G3>G5>G1 (Tabela 5.1).

Tabela 5.1 - Média e desvio padrão dos valores de perda de substrato da análise perfilométrica *in vitro* (μm)

Grupos Experimentais (n=8)	Valores de perda de substrato
G1 – ácido cítrico 0,5%, 3x/dia, 2 min	2,98 ± 0.58 ^F
G2 - ácido cítrico 0,5%, 6x/dia, 2 min	8,32 ± 0,50 ^D
G3 – ácido cítrico 0,5%, 3x/dia, 5 min	8,03 ± 0,86 ^D
G4 - ácido cítrico 0,5%, 6x/dia, 5 min	24,03 ± 0,99 ^A
G5 – ácido cítrico 1,0%, 3x/dia, 2 min	5,70 ± 0,72 ^E
G6 - ácido cítrico 1,0%, 6x/dia, 2 min	16,29 ± 1,75 ^C
G7 - ácido cítrico 1,0%, 3x/dia, 5 min	20,27 ± 1,18 ^B

^{*}Médias que não compartilham uma letra são significativamente diferentes.

5.2 Resultados da etapa in situ

Após constatação de que os dados atendiam à homocedasticidade (teste de Levene: p = 0,147) e à distribuição normal (teste de Shapiro Wilk: p > 0,05). A análise de variância a dois critérios para blocos casualizados demonstrou que não houve interação significativa entre as variáveis independentes "Tipo de Tratamento" e "Película Adquirida" (p = 0,211). Constatou-se efeito estatisticamente significativo do fator principal "Tipo de Tratamento" (p < 0,001), sendo que, em relação ao grupo

controle (sem tratamento), o desgaste do esmalte foi significativamente menor mediante a aplicação da solução fluoretada, independentemente se esta foi aplicada prévia ou posteriormente ao desafio erosivo, quer seja na presença ou ausência de película (Tabela 5.2). Examinando-se o efeito do fator principal "Película Adquirida", verificou-se que o desgaste do esmalte não foi afetado pela presença ou ausência da película adquirida (p = 0,109), independentemente do tipo de tratamento.

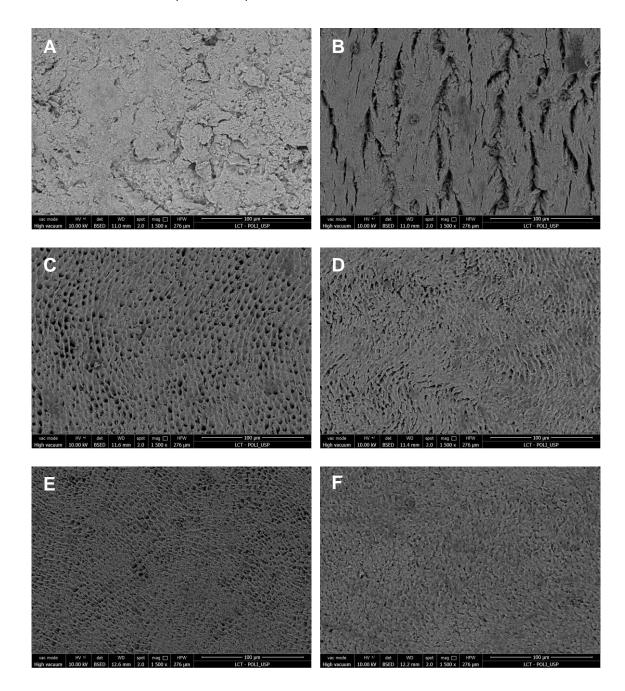
Tabela 5.2 - Médias e desvios padrão do desgaste do esmalte (em μm), segundo o tratamento, na presença ou ausência de película adquirida

Tratamento	Com película	Sem película	Média geral
Sem tratamento	14,77 (2,87)	15,10 (2,84)	14,93 (2,79) ^B
Solução aplicada antes da 1ª erosão diária	8,90 (3,66)	7,12 (4,46)	8,00 (4,09) ^A
Solução aplicada após a 1ª erosão diária 9,32 (4,65)		8,40 (4,21)	8,86 (4,37) ^A
Média geral	11,00 (4,58) ^a	10,21 (5,19) ^a	-

Médias gerais seguidas por letras maiúsculas distintas indicam diferença estatisticamente significativa entre tratamentos, independentemente da presença ou ausência de película adquirida. Médias gerais seguidas por letras minúsculas iguais indicam ausência de diferença estatisticamente significativa entre amostras com e sem película, independentemente do tratamento aplicado.

A análise observacional em MEV mostrou que as características morfológicas superficiais do esmalte (Figura 4.2) diferiram entre os grupos experimentais quando comparado ao fator "Tipo de tratamento", porém não foram observadas diferenças quando considerado o fator "Película adquirida" ou o "Momento de aplicação" da solução de AmF/NaF/SnCl₂. As amostras que não receberam tratamento, com ou sem a presença da película, apresentaram características semelhantes, tendo sido observada uma superfície irregular e rugosa, o que corresponde a uma superfície erodida. Já nas amostras tratadas com a solução de AmF/NaF/SnCl₂, independente da presença ou ausência de película ou da aplicação antes ou depois da primeira erosão diária, a morfologia observada aparenta ser menos irregular que os grupos controle negativo, se assemelhando a um padrão de condicionamento ácido, ficando mais evidentes os prismas de esmalte de formato hexagonal.

Figura 5.1 – Eletromicrografias obtidas na MEV das amostras após erosão *in situ.* (A – Sem tratamento, em ausência da película adquirida; B - Sem tratamento e com presença de película; C - AmF/NaF/SnCl₂ aplicada após a 1ª imersão ácida diária, em ausência da película; D - AmF/NaF/SnCl₂ aplicada após a 1ª imersão ácida, com presença da película; E - AmF/NaF/SnCl₂ aplicada antes da 1ª imersão ácida diária, com presença de película adquirida; F- AmF/NaF/SnCl₂ aplicada antes da 1ª imersão ácida diária, em ausência de película adquirida



.

6 DISCUSSÃO

Atualmente, o conhecimento no campo de erosão dental deriva quase exclusivamente da pesquisa laboratorial in vitro e in situ e, atualmente, há pouca evidência de estudos clínicos (Ganss et al., 2012a), sendo poucos os artigos clínicos publicados até o momento (Sundaram et al., 2007; Hjortsjö et al., 2009a,b,c; Bartlett et al., 2011; López-Frías et al., 2012). Deste modo, estudos in situ mostram-se uma boa alternativa por ter o potencial de estudar os aspectos fundamentais do desenvolvimento dos processos de erosão o mais próximo possível da situação clínica (Wiegand; Attin, 2011). Ainda assim, parâmetros experimentais devem ser escolhidos com cuidado para assegurar que o problema seja investigado de modo apropriado e em condições padronizadas (Wiegand; Attin, 2011). O protocolo de desmineralização é um parâmetro chave em experimentos de erosão, porém pouco se sabe sobre como as variações no protocolo, em particular, com vários fatores combinados, impactam os resultados do estudo, como a dimensão da perda de tecido ou eficácia dos agentes ativos. Sendo assim, a etapa in vitro deste estudo foi desenvolvida para investigar o impacto da variação do desafio erosivo em termos de concentração do ácido, quantidade e duração das imersões do ácido, na perda de superfície no esmalte dental.

Idealmente, o método de ciclagem deve possibilitar testar adequadamente os efeitos dos agentes anti-erosivos, devendo proporcionar condições moderadas o suficiente para identificar diferenças entre as formulações de flúor e ainda, relativamente severas o suficiente para permitir a mensuração adequada através da perfilometria e para simular condições clínicas que podem ocorrer em pacientes com alto risco de erosão (Schlueter et al., 2009d, Ganss et al., 2010a; da Silva et al., 2017a). Condições erosivas que são muito severas ou muito leves podem não ter poder discriminatório, resultando em um mascaramento de efeitos, que não podem ser comprovados sob condições clínicas (Schlueter el al., 2016).

Os estudos de erosão dental existentes na literatura variam consideravelmente nos parâmetros da ciclagem como tempo total de erosão (intervalo entre 30 se 60 h), quantidade de imersões (entre 1 e 10), duração de

cada imersão (entre 15 s e 40 min), tipo de ácido (bebidas ácidas, ácido cítrico, ácido fosfórico e ácido clorídrico), concentração do ácido (faixa entre 0,3 e 6,0%), pH (intervalo entre 1,4 e 4,0) e movimento de ácido (não denominado, estático, banho de agitação, agitador magnético e fluxo contínuo) (Schlueter et al., 2016). Para este estudo, foram escolhidos como parâmetros fixos: o ácido cítrico, por ser o tipo de ácido extrínseco mais comum na indústria alimentícia e o utilizado em estudos de erosão (West et al., 2001; Shellis et al., 2011; Schlueter et al., 2016); pH, sendo utilizado o pH nativo da solução (entre 2,3 e 2,5), por desempenhar uma influência menor no resultado quando considerada pequena variação (Barbour et al., 2003; Schlueter et al., 2016) e movimento da solução, sendo realizado sob agitação orbital (35 rpm). Já os fatores variáveis foram considerados: a concentração do ácido a 0,5% (Ganss et al., 2012b) ou 1,0% (Ganss et al., 2011), por serem as concentrações de ácido cítrico mais comumente encontradas na literatura (Schlueter et al., 2016); a quantidade de imersões diárias, sendo 6x/dia, por ser a mais utilizada (Ganss et al., 2008) ou 3x/dia, com o objetivo de simplificar a ciclagem; e a duração de cada imersão, de 2 min, que é a utilizada com maior frequência em estudos in vitro (Ganss et al. 2008; Schlueter et al., 2009b), ou 5 min, a mais utilizada em estudos in situ (Schlueter et al., 2009b; Ganss et al., 2010a).

A variação dos fatores "concentração do ácido", "tempo de exposição ao ácido" e "frequência das imersões" influenciaram substancialmente os resultados do estudo *in vitro*, sendo a primeira hipótese nula rejeitada. A concentração pode ser considerada um fator majoritário na taxa de dissolução do esmalte (Shellis et al., 2013; Hughes et al., 2000; Schlueter et al., 2016), tendo sido descrita em cariologia como responsável por aumentar a quantidade da forma não dissociada do ácido orgânico, que se difunde rapidamente através dos poros subsuperficiais do esmalte, devido à sua falta de carga, agindo como um portador móvel de H⁺ para os locais de desmineralização (Gray, 1961, 1966; Featherstone; Rodgers, 1981; Shellis et al., 2013). Este argumento é também aplicável à erosão, onde a dissolução ocorre não apenas na interface entre a solução e o esmalte, mas também dentro da fina, parcialmente desmineralizada, camada amolecida. Este processo, descrito como "desmineralização próxima da superfície", portanto, é altamente dependente da concentração do ácido (Shellis et al., 2013; Lussi; Carvalho,

2014). O aumento do tempo total de exposição ao ácido mostrou ter uma relação direta com a perda mineral, o que foi semelhante ao encontrado em outros estudos da literatura (Meurman; Frank, 1991; Millward et al., 1995; Amaechi et al., 1999; Eisenburger; Addy, 2001), especialmente se o ataque ácido é de longa duração e repetido ao longo do tempo (Meurman; ten Cate, 1996). Como os desafios prolongados e repetitivos num curto período de tempo fornecem íons H+ com frequência, dificultando que o equilíbrio iônico ao redor do substrato seja mantido, a dissolução do esmalte acontece continuadamente o que impossibilita que o processo de remineralização ocorra, visto que esse processo se dá a um ritmo lento (Garberoglio; Cozzani, 1979), podendo levar até 6h (Eisenburger et al., 2001).

A partir dos resultados obtidos na etapa *in vitro*, foi possível concluir que é possível reduzir a frequência das imersões diárias e, portanto, reduzir o tempo de ciclagem e simplificá-la, aumentando a concentração do ácido e a duração dos desafios erosivos. Com o protocolo de 3 imersões diárias de 5 minutos cada, em ácido cítrico a 1%, foi possível reduzir o tempo de ciclagem diária e, ainda assim, obter um padrão de erosão moderada, com perda tecidual de 20,27 ± 1,18 micrometros em esmalte dental humano. Os resultados enfatizam claramente a necessidade de padronização completa dos protocolos experimentais, uma vez que os resultados obtidos por um desenho de estudo podem não ser comparáveis com os de outro desenho.

Contudo, como a erosão *in vitro* raramente concorda quantitativamente com a erosão *in situ*, uma vez que os efeitos protetores naturais da cavidade oral são de grande importância (West et al., 2011), para a etapa *in situ* deste estudo, foi adicionada uma imersão diária ao protocolo *in vitro* escolhido, totalizando 4 imersões de 5 minutos cada. Os resultados da etapa *in situ* mostram que o protocolo de desmineralização escolhido atingiu o objetivo proposto, sendo o padrão de lesão obtido considerado moderado (média geral dos grupos sem tratamento (só erosão): 14,93 ± 2,79). A maioria das revisões sobre modelos experimentais de erosão preconizam que a duração do desafio não deve ultrapassar 2 min (Wiegand; Attin 2011; Shellis et al., 2011), pois o pH do fluido oral permanece num pH crítico por um curto período, retornando às condições neutras de 1 a 3 minutos após a exposição ao ácido (Imfeld, 1983; Meurman et al., 1987; Millward et al.,1997). Entretanto, em alguns casos,

o pH pode levar de 4 a 10 min para retornar ao normal (Imfeld, 1983), o que mostra que o aumento da duração da exposição ao ácido nos modelos experimentais pode reproduzir condições clínicas extremas (Ganss et al., 2001b, 2010a; Schlueter et al., 2009a, b, 2011, 2016).

Dada a crescente prevalência de erosão dentária (Kreulen et al., 2010; Jaeggi; Lussi, 2014) e considerando que a desmineralização erosiva pode resultar em perda irreversível da superfície do tecido dentário, o desenvolvimento de estratégias de prevenção é fundamental, e o entendimento de como elas funcionam também. Os íons flúor e estanho têm sido usados com sucesso como agentes preventivos contra a erosão do esmalte, sendo relatadas reduções na perda de tecido na ordem de 64-91%. Apesar da solução de AmF/NaF/SnCl₂ atualmente ser considerada 'padrão-ouro' para prevenção/controle de erosão dental (Ganss et al., 2010a; Rakhmatullina et al., 2013), pouco se sabe sobre como os componentes salivares e a película adquirida interferem na interação do estanho e dos compostos fluoretados com o substrato dental. Portanto, parece relevante e importante estudar a interação entre o íon estanho e a película adquirida, e como essa interação pode influenciar a proteção contra o desgaste erosivo. Sendo assim, a etapa in situ deste estudo avaliou se a presença da película adquirida e o momento da aplicação interferem na ação anti-erosiva da solução de AmF/NaF/SnCl₂.

O composto fluoretado escolhido para este estudo foi a solução composta de AmF/NaF/SnCl₂ comercialmente disponível (Elmex® Erosion Protection dental rinse). Neste estudo, quando comparada aos grupos controle negativo sem tratamento (G1 e G2), esta solução demostrou ser eficaz na redução em até 46% da perda de tecido mineral em esmalte dental humano sob desafios erosivos *in situ*. Este resultado corrobora com outros estudos *in situ* que utilizaram a mesma solução para prevenção de erosão dental (Schlueter el al., 2009a, 2011; Ganss et al., 2010a; da Silva et al., 2017b; Ramos-Oliveira et al., 2017). A eficácia dos produtos contendo estanho no esmalte erodido se deve ao seu mecanismo de ação, que está relacionado a duas frentes (Lussi; Carvalho, 2015): deposição de estanho na superfície dentária pela reação entre íons estanho e hidroxiapatita, que produz CaF₂, Sn₂OHPO₄ e Sn₃F₃PO₄, Ca(SnF₃)₂ sais (Babcock et al., 1978), formando uma camada estável, relativamente resistente ao ácido (Hove et al., 2006; Ganss et al., 2008); e a

eventual incorporação de estanho em até 20 µm de profundidade no esmalte, durante o complexo processo de desmineralização-remineralização, resultando em aumento da resistência ao ácido (Schlueter et al., 2009b).

A remoção da película se deu através da aplicação do SDS, visto que as proteínas salivares se ligam às moléculas de dodecil sulfato, prevenindo a deposição das proteínas devido ao aumento das forças de repulsão eletrostática entre as superfícies e as proteínas (Arnebrant; Simonsson, 1991; Vassilakos et al., 1992b; Wahlgren et al., 1993; Welin-Klinstr et al., 1993). É um método químico para remoção da película, que, apesar de promover uma remoção apenas parcial, mantendo a camada basal (Hannig et al., 2005a), foi escolhido por não promover perda de tecido como alguns agentes desmineralizantes (como EDTA, HCI e NaOCI), ou métodos químicosmecânicos (como fricção dos agentes químicos e raspagem com cureta), que poderiam promover a remoção da camada superficial amolecida e parcialmente desmineralizada, mais suscetível à abrasão (Lussi et al. 2014; Steiger-Ronay et al., 2019). A camada basal da película é considerada mais resistente à dissolução química e abrasão mecânica do que a camada globular (Hannig et al., 2005a), sendo considerada mais importante na proteção da superfície do esmalte (Hannig; Balz, 1999, 2001; Hannig, 2002; Hannig et al., 2003). È possível que, se a remoção da película tivesse sido total, houvesse diferença nos resultados. Considerando que pouco se sabe como o estanho e o flúor interagem com a película, é difícil supor em qual camada de proteínas essa interação acontece, e se esta ocorresse prioritariamente na camada basal, a remoção parcial não teria influenciado na efetividade dos compostos.

Os resultados experimentais *in situ* demonstraram que a presença da película adquirida não influenciou no potencial anti-erosivo da solução de AmF/NaF/SnCl₂, e, portanto, a segunda hipótese nula não foi rejeitada. Diversos estudos que investigaram a formação da película em substrato exposto a compostos fluoretados contendo estanho mostram que esse tratamento, além de auxiliar a estabilização dos precipitados na superfície (Ganss et al., 2007, Hove et al., 2007; Khambe et al., 2014), favorece a interligação entre as proteínas que compõem a película (Veeregowda et al., 2011; Algarni et al., 2015), modulando sua formação (Siqueira et al., 2012b) e sugerem aumentar sua resistência à desmineralização (Siqueira et al., 2012b;

Algarni et al., 2015; Kensche et al., 2017, 2019). No entanto, nas condições do presente estudo *in situ*, essas alterações não influenciaram a eficácia da solução de AmF/NaF/SnCl₂ frente a desafios erosivos severos. A presença da película adquirida também não influenciou o grupo sem tratamento, o que já era esperado, visto que a proteção da película contra a desmineralização limita-se a desafios erosivos menos severos (Hara et al., 2006).

Os diversos estudos na literatura que utilizam compostos fluoretados para prevenção de erosão variam não só na metodologia de ciclagem erosiva, mas também no modo como os fluoretos são aplicados, antes ou após a primeira erosão diária. A aplicação da solução de AmF/NaF/SnCl₂ previamente ao desafio erosivo poderia ter melhor eficácia devido ao mecanismo de ação do estanho associado a fluoretos (O'Toole et al., 2015), visto que este se baseia na deposição dos sais na superfície, formando uma camada amorfa ácidoresistente, propiciando maior proteção contra a desmineralização subsequente (Schlueter et al., 2009c). Entretanto, como após o desafio erosivo as ligações aniônicas entre as proteínas e a superfície do esmalte são enfraquecidas, restando uma camada basal não inteiramente madura, a capacidade de atuar como barreira de difusão da película é reduzida (Zahradnik, 1979), a aplicação da solução após o desafio erosivo poderia favorecer a deposição de sais e a incorporação de íons de estanho à superfície, melhorando sua eficácia. Considerando ainda que a aplicação das soluções fluoretadas, em especial as contendo estanho, previamente à formação da película pode levar a modulações na formação e a alterações ultra-estruturais e das propriedades físico-químicas da película in situ, sendo capaz de aumentar sua capacidade protetora frente à desafios ácidos, a aplicação dos enxaguatórios bucais logo após o desafio erosivo poderia levar à remodelação de uma película adquirida menos susceptível à desmineralização. Sendo assim, foram incluídos neste estudo grupos que consideraram a aplicação da solução antes e após a primeira erosão diária, ambos considerando a presença ou ausência da película adquirida. Entretanto, a variação no momento em que a solução foi aplicada não influenciou sua eficácia, seja com ou sem presença da película adquirida, e, portanto, a terceira hipótese nula não foi rejeitada. Este resultado difere de resultado do estudo feito por O'Toole e colaboradores (2015), que constatou que a aplicação da solução fluoretada contendo estanho foi mais

eficaz quando aplicada previamente ao primeiro desafio erosivo diário, porém este foi conduzido *in vitro*, com ou sem presença de saliva humana, e com ciclagem erosiva mais suave. Sendo o nosso o primeiro estudo in situ a investigar o momento da aplicação da solução de AmF/NaF/SnCl₂.

Além disso, até o momento, este é o primeiro estudo que considerou a presença da película adquirida na eficácia da solução de AmF/NaF/SnCl₂ sob condições erosivas *in situ*, incluindo ainda o momento da aplicação da solução. Apesar de diversos estudos *in vitro* mostrarem que a interação entre a película adquirida e a solução fluoretada contendo estanho confere maior proteção ao substrato contra erosão dental, por favorecer a estabilização dos precipitados sobre a superfície (Ganss et al., 2007; Hove et al., 2007; Khambe et al., 2014) e por modular a formação e alterar as propriedades físico-químicas da película adquirida (Siqueira et al., 2012b; Algarni et al., 2015; Kensche et al., 2017, 2019), este estudo demonstrou que estas alterações não foram relevantes para as condições *in situ*, ao menos no modelo de ciclagem erosiva moderada escolhida. O que indica que clinicamente, em pacientes de alto risco de erosão, essas alterações são inexpressivas diante da magnitude do desafio erosivo.

Considerando que a erosão dental é altamente influenciada por fatores biológicos, em especial os impostos pela película adquirida, estudos que avaliem como os agentes antierosivos interagem com estes fatores são de grande importância, com alto potencial para o avanço do desenvolvimento de novas medidas preventivas de erosão e aprimoramento das já existentes. É importante lembrar que, apesar da importância dos estudos *in vitro*, nem sempre refletem integralmente o que é observado *in vivo*, o que ressalta a importância dos estudos que mais se aproximem das condições clínicas.

7 CONCLUSÕES

- Na etapa in vitro, foi possível concluir que a concentração, a frequência e a duração das exposições ao ácido, influenciam na dimensão da perda de tecido duro dental.
- Na etapa *in situ*, foi possível concluir que a presença da película adquirida e o momento da aplicação da solução anti-erosiva não influenciaram a eficácia da solução de AmF/NaF/SnCl₂ contra a erosão dentária.

REFERÊNCIAS1

Algarni AA, Mussi MC, Moffa EB, Lippert F, Zero DT, Siqueira WL, Hara AT. The impact of stannous, fluoride ions and its combination on enamel pellicle proteome and dental erosion prevention. PLoS One. 2015 Jun 1;10(6):e0128196. doi: 10.1371/journal.pone.0128196. eCollection 2015.

Ali DA, Brown RS, Rodriguez LO, Moody EL, Nasr MF. Dental erosion caused by silent gastroesophageal reflux disease. J Am Dent Assoc. 2002 Jun;133(6):734-7; quiz 768-9.

Amaechi BT, Higham SM, Edgar WM, Milosevic A. Thickness of acquired salivary pellicle as a determinant of the sites of dental erosion. J Dent Res. 1999 Dec;78(12):1821-8.

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

Armstrong WG. Origin and nature of the acquired pellicle. Proc R Soc Med. 1968 Sep;61(9):923-30.

Arnebrant T, Simonsson T. The effect of ionic surfactants on salivary proteins adsorbed on silica surfaces. Acta Odontol Scand. 1991 Oct;49(5):281-8.

Attin T, Koidl U, Buchalla W, Schaller HG, Kielbassa AM, Hellwig E. Correlation of microhardness and wear in differently eroded bovine dental enamel. Arch Oral Biol. 1997 Mar;42(3):243-50.

Attin T, Deifuss H, Hellwig E. Influence of acidified fluoride gel on abrasion resistance of eroded enamel. Caries Res. 1999;33(2):135-9.

Azzopardi A, Bartlett DW, Watson TF, Sherriff M. The surface effects of erosion and abrasion on dentine with and without a protective layer. Br Dent J. 2004 Mar 27;196(6):351-4; discussion 339.

Babcock FD, King JC, Jordan TH. The reaction of stannous fluoride and hydroxyapatite. J Dent Res. 1978 Sep-Oct;57(9-10):933-8.

_

¹ De acordo com Estilo Vancouver.

Barbour ME, Parker DM, Allen GC, Jandt KD. Enamel dissolution in citric acid as a function of calcium and phosphate concentrations and degree of saturation with respect to hydroxyapatite. Eur J Oral Sci. 2003 Oct;111(5):428-33.

Bartlett DW, Shah P. A critical review of non-carious cervical (wear) lesions and the role of abfraction, erosion, and abrasion. J Dent Res. 2006 Apr;85(4):306-12. Review.

Bartlett D, Sundaram G, Moazzez R. Trial of protective effect of fissure sealants, in vivo, on the palatal surfaces of anterior teeth, in patients suffering from erosion. J Dent. 2011 Jan;39(1):26-9. doi: 10.1016/j.jdent.2010.09.007. Epub 2010 Oct 7.

Bartlett DW, Lussi A, West NX, Bouchard P, Sanz M, Bourgeois D. Prevalence of tooth wear on buccal and lingual surfaces and possible risk factors in young European adults. J Dent. 2013 Nov;41(11):1007-13. doi: 10.1016/j.jdent.2013.08.018. Epub 2013 Sep 1.

Bennick A, Chau G, Goodlin R, Abrams S, Tustian D, Madapallimattam G. The role of human salivary acidic proline-rich proteins in the formation of acquired dental pellicle in vivo and their fate after adsorption to the human enamel surface. Arch Oral Biol. 1983;28(1):19-27.

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

Carlén A, Börjesson AC, Nikdel K, Olsson J. Composition of pellicles formed in vivo on tooth surfaces in different parts of the dentition, and in vitro on hydroxyapatite. Caries Res. 1998;32(6):447-55.

Carpenter G, Cotroneo E, Moazzez R, Rojas-Serrano M, Donaldson N, Austin R, Zaidel L, Bartlett D, Proctor G. Composition of enamel pellicle from dental erosion patients. Caries Res. 2014;48(5):361-7. doi: 10.1159/000356973. Epub 2014 Mar 6.

Carvalho TS, Lussi A. Combined effect of a fluoride-, stannous- and chitosan-containing toothpaste and stannous-containing rinse on the prevention of initial enamel erosion-abrasion. J Dent. 2014 Apr;42(4):450-9. doi: 10.1016/j.jdent.2014.01.004. Epub 2014 Jan 15.

Carvalho TS, Colon P, Ganss C, Huysmans MC, Lussi A, Schlueter N, Schmalz G, Shellis RP, Tveit AB, Wiegand A. Consensus report of the European Federation of Conservative Dentistry: erosive tooth wear--diagnosis and management. Clin Oral I nvestig. 2015 Sep;19(7):1557-61. doi: 10.1007/s00784-015-1511-7. Epub 2015 Jul 1.

Chaussain-Miller C, Fioretti F, Goldberg M, Menashi S. The role of matrix metalloproteinases (MMPs) in human caries. J Dent Res. 2006 Jan;85(1):22-32. Review.

Cheng ZJ, Wang XM, Cui FZ, Ge J, Yan JX. The enamel softening and loss during early erosion studied by AFM, SEM and nanoindentation. Biomed Mater. 2009 Feb;4(1):015020. doi: 10.1088/1748-6041/4/1/015020. Epub 2009 Feb 4.

Cooley WE: Reactions of tin(II) and fluoride ions with etched enamel. J Dent Res 1961; 40: 1199–1210.

Comar LP, Gomes MF, Ito N, Salomão PA, Grizzo LT, Magalhães AC. Effect of NaF, SnF(2), and TiF(4) Toothpastes on Bovine Enamel and Dentin Erosion-Abrasion In Vitro. Int J Dent. 2012;2012:134350. doi: 10.1155/2012/134350. Epub 2012 Nov 8.

da Silva CV, Nazello JL, de Freitas PM. Frequency of Application of AmF/NaF/SnCl2 Solution and Its Potential in Inhibiting the Progression of Erosion in Human Dental Enamel - An In Vitro Study. Oral Health Prev Dent. 2017a;15(4):365-370. doi: 10.3290/j.ohpd.a38739.

da Silva CV, Ramos-Oliveira TM, Mantilla TF, de Freitas PM. Frequency of Application of AmF/NaF/SnCl2 Solution and Its Potential in Controlling Human Enamel Erosion Progression: An in situ Study. Caries Res. 2017b;51(2):141-8. doi: 10.1159/000455051. Epub 2017 Jan 27.

Dawes C. The effects of flow rate and duration of stimulation on the condentrations of protein and the main electrolytes in human parotid saliva. Arch Oral Biol. 1969 Mar;14(3):277-94

Dodds MW, Johnson DA, Yeh CK. Health benefits of saliva: a review. J Dent. 2005 Mar;33(3):223-33. Epub 2004 Dec 19. Review.

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

Eisenburger M, Addy M. Evaluation of pH and erosion time on demineralisation. Clin Oral Investig. 2001 Jun;5(2):108-11.

Eisenburger M, Shellis RP, Addy M. Comparative study of wear of enamel induced by alternating and simultaneous combinations of abrasion and erosion in vitro. Caries Res. 2003 Nov-Dec;37(6):450-5.

European Food Safety Authority (EFSA): Opinion of the Scientific Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies on a request from the Commission related to the Tolerable Upper Intake Level of Tin. EFSA J 2005; 254: 1–25.

Featherstone JD, Rodgers BE. Effect of acetic, lactic and other organic acids on the formation of artificial carious lesions. Caries Res. 1981;15(5):377-85.

Featherstone JD. Consensus conference on intra-oral models: evaluation techniques. J Dent Res. 1992 Apr;71 Spec No:955-6. Review.

Featherstone JD, Lussi A. Understanding the chemistry of dental erosion. Monogr Oral Sci. 2006;20:66-76.

Fejerskov O, Thylstrup A, Larsen MJ. Rational use of fluorides in caries prevention. A concept based on possible cariostatic mechanisms. Acta Odontol Scand. 1981;39(4):241-9. Review.

Finke M, Parker DM, Jandt KD. Influence of soft drinks on the thickness and morphology of in situ acquired pellicle layer on enamel. J Colloid Interface Sci. 2002 Jul 15;251(2):263-70.

Ganss C, Klimek J, Schäffer U, Spall T. Effectiveness of two fluoridation measures on erosion progression in human enamel and dentine in vitro. Caries Res. 2001a Sep-Oct;35(5):325-30.

Ganss C, Klimek J, Giese K. Dental erosion in children and adolescents--a cross-sectional and longitudinal investigation using study models. Community Dent Oral Epidemiol. 2001b Aug;29(4):264-71.

Ganss C, Klimek J, Brune V, Schürmann A. Effects of two fluoridation measures on erosion progression in human enamel and dentine in situ. Caries Res. 2004;38:561-6.

Ganss C, Schlueter N, Klimek J. Retention of KOH-soluble fluoride on enamel and dentine under erosive conditions--A comparison of in vitro and in situ results. Arch Oral Biol. 2007 Jan;52(1):9-14. Epub 2006 Oct 17.

Ganss C, Schlueter N, Hardt M, Schattenberg P, Klimek J. Effect of fluoride compounds on enamel erosion in vitro: a comparison of amine, sodium and stannous fluoride. Caries Res. 2008;42(1):2-7.

Ganss C, Neutard L, von Hinckeldey J, Klimek J, Schlueter N. Efficacy of a tin/fluoride rinse: a randomized in situ trial on erosion. J Dent Res. 2010a Nov;89(11):1214-8. doi: 10.1177/0022034510375291.

Ganss C, Lussi A, Sommer N, Klimek J, Schlueter N. Efficacy of fluoride compounds and stannous chloride as erosion inhibitors in dentine. Caries Res. 2010b;44(3):248-52. doi: 10.1159/000314671.

Ganss C, Young A, Lussi A. Tooth wear and erosion: methodological issues in epidemiological and public health research and the future research agenda. Community Dent Health. 2011 Sep;28(3):191-5.

Ganss C, Lussi A, Schlueter N. Dental erosion as oral disease. Insights in etiological factors and pathomechanisms, and current strategies for prevention and therapy. Am J Dent. 2012a Dec;25(6):351-64.

Ganss C, von Hinckeldey J, Tolle A, Schulze K, Klimek J, Schlueter N. Efficacy of the stannous ion and a biopolymer in toothpastes on enamel erosion/abrasion. J Dent. 2012b Dec;40(12):1036-43. doi: 10.1016/j.jdent.2012.08.005. Epub 2012 Aug 20.

Ganss C, Klimek J, Schlueter N. Erosion/abrasion-preventing potential of NaF and F/Sn/chitosan toothpastes in dentine and impact of the organic matrix. Caries Res. 2014;48(2):163-9. doi: 10.1159/000354679. Epub 2014 Jan 3.

Ganss C, Lussi A, Peutzfeldt A, Naguib Attia N, Schlueter N. Impact of Sn/F Pre-Treatments the Durability of Protective Coatings against Dentine on Erosion/Abrasion. **PLoS** One. 2015 Jun 15;10(6):e0123889. doi: 10.1371/journal.pone.0123889. eCollection 2015.

Garberoglio R, Cozzani G. In vivo effect of oral environment on etched enamel: a scanning electron microscopic study. J Dent Res. 1979 Sep;58(9):1859-65.

Gerrard WA, Winter PJ. Evaluation of toothpastes by their ability to assist rehardening of enamel in vitro. Caries Res. 1986;20(3):209-16.

Gracia LH, Rees GD, Brown A, Fowler CE. An in vitro evaluation of a novel high fluoride daily mouthrinse using a combination of microindentation, 3D profilometry and DSIMS. J Dent. 2010 Nov;38 Suppl 3:S12-20. doi: 10.1016/S0300-5712(11)70004-5.

Gray JA. Kinetics of the dissolution of human dental enamel in acid. J Dent Res. 1962 May-Jun;41:633-45.

Gray JA. Kinetics of enamel dissolution during formation of incipient caries-like lesions. Arch Oral Biol. 1966 Apr;11(4):397-422.

Gron P, Hay DI. Inhibition of calcium phosphate precipitation by human salivary secretions. Arch Oral Biol. 1976;21(3):201-5.

Hay DI. The interaction of human parotid salivary proteins with hydroxyapatite. Arch Oral Biol. 1973 Dec;18(12):1517-29.

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

Hannig M, Balz M. Influence of in vivo formed salivary pellicle on enamel erosion. Caries Res. 1999 Sep-Oct;33(5):372-9.

Hannig M, Balz M. Protective properties of salivary pellicles from two different intraoral sites on enamel erosion. Caries Res. 2001 Mar-Apr;35(2):142-8.

Hannig M. The protective nature of the salivary pellicle. Int Dent J 2002, 52:417–423.

Hannig M1, Hess NJ, Hoth-Hannig W, De Vrese M. Influence of salivary pellicle formation time on enamel demineralization--an in situ pilot study. Clin Oral Investig. 2003 Sep;7(3):158-61. Epub 2003 Jul 26.

Hannig M, Fiebiger M, Güntzer M, Döbert A, Zimehl R, Nekrashevych Y. Protective effect of the in situ formed short-term salivary pellicle. Arch Oral Biol. 2004 Nov;49(11):903-10.

Hannig M, Khanafer AK, Hoth-Hannig W, Al-Marrawi F, Açil Y. Transmission electron microscopy comparison of methods for collecting in situ formed enamel pellicle. Clin Oral Investig. 2005a Mar;9(1):30-7. Epub 2004 Sep 16.

Hannig C, Hannig M, Attin T. Enzymes in the acquired enamel pellicle. Eur J Oral Sci. 2005b Feb;113(1):2-13. Review.

Hara AT, Ando M, González-Cabezas C, Cury JA, Serra MC, Zero DT. Protective effect of the dental pellicle against erosive challenges in situ. J Dent Res. 2006 Jul;85(7):612-6.

Hara AT, Lippert F, Zero DT. Interplay between experimental dental pellicles and stannous-containing toothpaste on dental erosion-abrasion. Caries Res. 2013;47(4):325-9. doi: 10.1159/000347051. Epub 2013 Mar 7.

Hercules DM, Craig NL. Composition of fluoridated dental enamel studied by x-ray photoelectron spectroscopy (ESCA). J Dent Res. 1976 Sep-Oct;55(5):829-35.

Hermont AP, Oliveira PA, Martins CC, Paiva SM, Pordeus IA, Auad SM. Tooth erosion and eating disorders: a systematic review and meta-analysis. PLoS One. 2014 Nov 7;9(11):e111123. doi: 10.1371/journal.pone.0111123. eCollection 2014.

Hjortsjö C, Jonski G, Thrane PS, Saxegaard E, Young A. The effects of acidic fluoride solutions on early enamel erosion in vivo. Caries Res. 2009a;43(2):126-31. doi: 10.1159/000209345. Epub 2009 Mar 24.

Hjortsjö C, Saxegaard E, Young A, Dahl JE. In vivo and in vitro irritation testing of low concentrations of hydrofluoric acid. Acta Odontol Scand. 2009b;67(6):360-5. doi: 10.1080/00016350903117118.

Hjortsjö C, Jonski G, Thrane PS, Saxegaard E, Young A. Effect of stannous fluoride and dilute hydrofluoric acid on early enamel erosion over time in vivo. Caries Res. 2009c;43(6):449-54. doi: 10.1159/000261415. Epub 2009 Nov 25.

Hove L, Holme B, Øgaard B, Willumsen T, Tveit AB. The protective effect of TiF4, SnF2 and NaF on erosion of enamel by hydrochloric acid in vitro measured by white light interferometry. Caries Res. 2006;40(5):440-3.

Hove LH, Holme B, Young A, Tveit AB. The erosion-inhibiting effect of TiF4, SnF2, and NaF solutions on pellicle-covered enamel in vitro. Acta Odontol Scand. 2007 Oct;65(5):259-64.

Hove LH, Holme B, Young A, Tveit AB. The protective effect of TiF4, SnF2 and NaF against erosion-like lesions in situ. Caries Res. 2008;42(1):68-72.

Hughes JA, West NX, Parker DM, van den Braak MH, Addy M. Effects of pH and concentration of citric, malic and lactic acids on enamel, in vitro. J Dent. 2000 Feb;28(2):147-52.

Huysmans MC, Jager DH, Ruben JL, Unk DE, Klijn CP, Vieira AM. Reduction of erosive wear in situ by stannous fluoride-containing toothpaste. Caries Res. 2011;45(6):518-23. doi: 10.1159/000331391. Epub 2011 Oct 5.

Imfeld TN. Identification of low caries risk dietary components. Monogr Oral Sci. 1983;11:1-198.

Imfeld T. Dental erosion. Definition, classification and links. Eur J Oral Sci. 1996 Apr;104(2 (Pt 2)):151-5.

Ingman T, Sorsa T, Lindy O, Koski H, Konttinen YT. Multiple forms of gelatinases/type IV collagenases in saliva and gingival crevicular fluid of periodontitis patients. J Clin Periodontol. 1994 Jan;21(1):26-31.

Jaeggi T, Lussi A. Toothbrush abrasion of erosively altered enamel after intraoral exposure to saliva: an in situ study. Caries Res. 1999 Nov-Dec;33(6):455-61.

Jaeggi T, Lussi A. Prevalence, incidence and distribution of erosion. Monogr Oral Sci. 2006;20:44-65. doi: 10.1159/000093350. Review.

Jaeggi T, Lussi A. Prevalence, incidence and distribution of erosion. Monogr Oral Sci. 2014;25:55-73. doi: 10.1159/000360973.

Jaeggi T, Lussi A. Prevalence, incidence and distribution of erosion. Monogr Oral Sci. 2006;20:44-65. Review.

Jensen JL, Lamkin MS, Oppenheim FG. Adsorption of human salivary proteins to hydroxyapatite: a comparison between whole saliva and glandular salivary secretions. J Dent Res. 1992 Sep;71(9):1569-76.

João-Souza SH, Bezerra SJC, de Freitas PM, de Lima NB, Aranha ACC, Hara AT, Scaramucci T. In situ evaluation of fluoride-, stannous- and polyphosphate-containing solutions against enamel erosion. J Dent. 2017 Aug;63:30-35. doi: 10.1016/j.jdent.2017.05.014. Epub 2017 May 25.

Kensche A, Kirsch J, Mintert S, Enders F, Pötschke S, Basche S, König B, Hannig C, Hannig M. Impact of customary fluoride rinsing solutions on the pellicle's protective properties and bioadhesion in situ. Sci Rep. 2017 Nov 29;7(1):16584. doi: 10.1038/s41598-017-16677-8.

Kensche A, Buschbeck E, König B, Koch M, Kirsch J, Hannig C, Hannig M. Effect of fluoride mouthrinses and stannous ions on the erosion protective properties of the in situ pellicle. Sci Rep. 2019 Mar 29;9(1):5336. doi: 10.1038/s41598-019-41736-7.

Khambe D1, Eversole SL, Mills T, Faller RV. Protective effects of SnF2 - Part II. Deposition and retention on pellicle-coated enamel. Int Dent J. 2014 Mar;64 Suppl 1:11-5. doi: 10.1111/idj.12097.

Koeser J, Carvalho TS, Pieles U, Lussi A. Preparation and optimization of calcium fluoride particles for dental applications. J Mater Sci Mater Med. 2014 Jul;25(7):1671-7. doi: 10.1007/s10856-014-5200-x. Epub 2014 Mar 30.

Kreulen CM, Van 't Spijker A, Rodriguez JM, Bronkhorst EM, Creugers NH, Bartlett DW. Systematic review of the prevalence of tooth wear in children and adolescents. Caries Res. 2010;44(2):151-9. doi: 10.1159/000308567. Epub 2010 Apr 10. Review.

Krutchkoff DJ, Jordan TH, Wei SH, Nordquist WD. Surface characterization of the stannous fluoride-enamel interaction. Arch Oral Biol. 1972 Jun;17(6):923-30.

Larsen MJ. Chemical events during tooth dissolution. J Dent Res. 1990 Feb;69 Spec No:575-80; discussion 634-6. Review.

Larsen MJ, Richards A. The influence of saliva on the formation of calcium fluoride-like material on human dental enamel. Caries Res. 2001 Jan-Feb;35(1):57-60.

Lendenmann U, Grogan J, Oppenheim FG. Saliva and dental pellicle--a review. Adv Dent Res. 2000 Dec;14:22-8.

Lepri TP, Scatolin RS, Colucci V, De Alexandria AK, Maia LC, Turssi CP, Corona SA. In Situ analysis of CO2 laser irradiation on controlling progression of erosive lesions on dental enamel. Microsc Res Tech. 2014 Aug;77(8):586-93. doi: 10.1002/jemt.22377. Epub 2014 May 14.

Levitch LC, Bader JD, Shugars DA, Heymann HO. Non-carious cervical lesions. J Dent. 1994 Aug;22(4):195-207.

Levy FM, Magalhães AC, Gomes MF, Comar LP, Rios D, Buzalaf MA. The erosion and abrasion-inhibiting effect of TiF(4) and NaF varnishes and solutions on enamel in vitro. Int J Paediatr Dent. 2012 Jan;22(1):11-6. doi: 10.1111/j.1365-263X.2011.01151.x. Epub 2011 Jun 20.

López-Frías FJ, Castellanos-Cosano L, Martín-González J, Llamas-Carreras JM, Segura-Egea JJ. Clinical measurement of tooth wear: Tooth wear indices. J Clin Exp Dent. 2012 Feb 1;4(1):e48-53. doi: 10.4317/jced.50592. eCollection 2012 Feb.

Lussi A, Jäggi T, Schärer S. The influence of different factors on in vitro enamel erosion. Caries Res. 1993;27(5):387-93.

Lussi A, Jaeggi T, Zero D. The role of diet in the aetiology of dental erosion. Caries Res. 2004;38 Suppl 1:34-44. Review.

Lussi A. Erosive tooth wear - a multifactorial condition of growing concern and increasing knowledge. Monogr Oral Sci. 2006;20:1-8.

Lussi A, Jaeggi T. Erosion--diagnosis and risk factors. Clin Oral Investig. 2008 Mar;12 Suppl 1:S5-13. doi: 10.1007/s00784-007-0179-z. Epub 2008 Jan 29. Review. Lussi A, Schlueter N, Rakhmatullina E, Ganss C. Dental erosion--an overview with emphasis on chemical and histopathological aspects. Caries Res. 2011;45 Suppl 1:2-12. doi: 10.1159/000325915.

Lussi A, Hellwig E, Klimek J. Fluorides - mode of action and recommendations for use. Schweiz Monatsschr Zahnmed. 2012;122(11):1030-42.

Lussi A, Carvalho TS. Erosive tooth wear: a multifactorial condition of growing concern and increasing knowledge. Monogr Oral Sci. 2014;25:1-15. doi: 10.1159/000360380. Epub 2014 Jun 26. Review.

Lussi A, Lussi J, Carvalho TS, Cvikl B. Toothbrushing after an erosive attack: will waiting avoid tooth wear? Eur J Oral Sci. 2014 Oct;122(5):353-9. doi: 10.1111/eos.12144. Epub 2014 Aug 8.

Lussi A, Carvalho TS. The future of fluorides and other protective agents in erosion prevention. Caries Res. 2015;49 Suppl 1:18-29. doi: 10.1159/000380886.

Lussi A, Buzalaf MAR, Duangthip D, Anttonen V, Ganss C, João-Souza SH, Baumann T, Carvalho TS. The use of fluoride for the prevention of dental erosion and erosive tooth wear in children and adolescents. Eur Arch Paediatr Dent. 2019 Feb 14. doi: 10.1007/s40368-019-00420-0. [Epub ahead of print] Review.

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

Magalhães AC, Wiegand A, Rios D, Buzalaf MA, Lussi A. Fluoride in dental erosion. Monogr Oral Sci. 2011a;22:158-70. doi: 10.1159/000325167. Epub 2011 Jun 23. Review.

Magalhães AC, Romanelli AC, Rios D, Comar LP, Navarro RS, Grizzo LT, Aranha AC, Buzalaf MA. Effect of a single application of TiF4 and NaF varnishes and solutions combined with Nd:YAG laser irradiation on enamel erosion in vitro. Photomed Laser Surg. 2011b Aug;29(8):537-44. doi: 10.1089/pho.2010.2886. Epub 2011 May 19.

Mäkelä M, Salo T, Uitto VJ, Larjava H. Matrix metalloproteinases (MMP-2 and MMP-9) of the oral cavity: cellular origin and relationship to periodontal status. J Dent Res. 1994 Aug;73(8):1397-406.

Mathews MS, Amaechi BT, Ramalingam K, Ccahuana-Vasquez RA, Chedjieu IP, Mackey AC, Karlinsey RL. In situ remineralisation of eroded enamel lesions by NaF rinses. Arch Oral Biol. 2012 May;57(5):525-30. doi: 10.1016/j.archoralbio.2011.10.010.

Meurman JH, Rytömaa I, Kari K, Laakso T, Murtomaa H. Salivary pH and glucose after consuming various beverages, including sugar-containing drinks. Caries Res. 1987;21(4):353-9.

Meurman JH, Frank RM. Progression and surface ultrastructure of in vitro caused erosive lesions in human and bovine enamel. Caries Res. 1991;25(2):81-7.

Meurman JH, ten Cate JM. Pathogenesis and modifying factors of dental erosion. Eur J Oral Sci. 1996 Apr;104(2 (Pt 2)):199-206.

Millward A, Shaw L, Smith AJ. In vitro techniques for erosive lesion formation and examination in dental enamel. J Oral Rehabil. 1995 Jan;22(1):37-42.

Millward A, Shaw L, Harrington E, Smith AJ. Continuous monitoring of salivary flow rate and pH at the surface of the dentition following consumption of acidic beverages. Caries Res. 1997;31(1):44-9.

Moazzez RV, Austin RS, Rojas-Serrano M, Carpenter G, Cotroneo E, Proctor G, Zaidel L, Bartlett DW. Comparison of the possible protective effect of the salivary pellicle of individuals with and without erosion. Caries Res. 2014;48(1):57-62. doi: 10.1159/000352042. Epub 2013 Nov 6.

Moss SJ. Dental erosion. Int Dent J. 1998 Dec;48(6):529-39. Review.

Mühlemann HR, Saxer UP: Reduction of plaque and gingivitis by stannous fluoride stabilized with amine fluoride (abstract). Caries Res 1981; 15: 186.

Nekrashevych Y, Stösser L. Protective influence of experimentally formed salivary pellicle on enamel erosion. An in vitro study. Caries Res. 2003 May-Jun;37(3):225-31.

Nelson KG, Bainbridge CA. SnHPO 4 from the reaction of stannous fluoride and hydroxyapatite at a low pH. J Dent Res. 1973 Mar-Apr;52(2):318-21.

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

Nordbø H, Leirskar J, Ngo H, Mount GJ, Wahlgren J. The influence of a matrix metalloproteinase on the remineralization of artificially demineralized dentin. Oral Health Prev Dent. 2003;1(4):267-72.

Øgaard B. Effects of fluoride on caries development and progression in vivo. J Dent Res. 1990 Feb;69 Spec No:813-9; discussion 820-3. Review.

Olley RC, Pilecki P, Hughes N, Jeffery P, Austin RS, Moazzez R, Bartlett D. An in situ study investigating dentine tubule occlusion of dentifrices following acid challenge. J Dent. 2012 Jul;40(7):585-93. doi: 10.1016/j.jdent.2012.03.008.

O'Toole S, Mistry M, Mutahar M, Moazzez R, Bartlett D. Sequence of stannous and sodium fluoride solutions to prevent enamel erosion. J Dent. 2015 Dec;43(12):1498-503. doi: 10.1016/j.jdent.2015.10.003. Epub 2015 Oct 8.

Petzold M. The influence of different fluoride compounds and treatment conditions on dental enamel: a descriptive in vitro study of the CaF(2) precipitation and microstructure. Caries Res. 2001;35 Suppl 1:45-51.

Rakhmatullina E, Beyeler B, Lussi A. Inhibition of enamel erosion by stannous fluoride containing rinsing solutions. Schweiz Monatsschr Zahnmed. 2013;123(4):296-302.

Ramalho KM, Eduardo CP, Heussen N, Rocha RG, Meyer-Lueckel H, Lampert F, Apel C, Esteves-Oliveira M. Randomized in situ study on the efficacy of CO2 laser irradiation in increasing enamel erosion resistance. Clin Oral Investig. 2019 May;23(5):2103-2112. doi: 10.1007/s00784-018-2648-y. Epub 2018 Sep 28.

Ramos-Oliveira TM, Ramos TM, Esteves-Oliveira M, Apel C, Fischer H, Eduardo Cde P, Steagall W, Freitas PM. Potential of CO2 lasers (10.6 µm) associated with fluorides in inhibiting human enamel erosion. Braz Oral Res. 2014;28:1-6. Epub 2014 Oct 17.

Ramos-Oliveira TM, Silva CV, Nunes PM, Turssi CP, Rechmann P, Freitas PM. AmF/NaF/SnCl2 solution reduces in situ enamel erosion - profilometry and cross-sectional nanoindentation analysis. Braz Oral Res. 2017 Mar 6;31:e20. doi: 10.1590/1807-3107BOR-2017.vol31.0020.

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

Rølla G, Ellingsen JE. Clinical effects and possible mechanisms of action of stannous fluoride. Int Dent J. 1994 Feb;44(1 Suppl 1):99-105. Review.

Rölla G, Ekstrand J: Fluoride in oral fluids and dental plaque. Em: Fejerskov O, Ekstrand J, Burt B A (Hrsg.): Fluoride in dentistry. Munksgaard, Copenhagen; 1996. P. 215–29.

Rykke M, Sønju T, Skjørland K, Rølla G. Protein adsorption to hydroxyapatite and to calcium fluoride in vitro and amino acid analyses of pellicle formed on normal enamel and on calcium-fluoride-covered enamel in vivo. Acta Odontol Scand. 1989 Aug;47(4):245-51.

Salas MM, Nascimento GG, Huysmans MC, Demarco FF. Estimated prevalence of erosive tooth wear in permanent teeth of children and adolescents: an epidemiological systematic review and meta-regression analysis. J Dent. 2015 Jan;43(1):42-50. doi: 10.1016/j.jdent.2014.10.012.

Saxegaard E, Rölla G. Fluoride acquisition on and in human enamel during topical application in vitro. Scand J Dent Res. 1988 Dec;96(6):523-35.

Saxegaard E, Rølla G. Kinetics of acquisition and loss of calcium fluoride by enamel in vivo. Caries Res. 1989;23(6):406-11.

Scatolin RS, Colucci V, Lepri TP, Alexandria AK, Maia LC, Galo R, Borsatto MC, Corona SA. Er:YAG laser irradiation to control the progression of enamel erosion: an in situ study. Lasers Med Sci. 2015a Jul;30(5):1465-73. doi: 10.1007/s10103-014-1620-6. Epub 2014 Jul 2

Scatolin RS, Alonso-Filho FL, Galo R, Rios D, Borsatto MC, Corona AS CO₂ laser emission modes to control enamel erosion. Microsc Res Tech. 2015b Aug;78(8):654-9. doi: 10.1002/jemt.22518. Epub 2015 May 19.

Schlueter N, Ganss C, Mueller U, Klimek J. Effect of titanium tetrafluoride and sodium fluoride on erosion progression in enamel and dentine in vitro. Caries Res. 2007;41(2):141-5.

Schlueter N, Klimek J, Ganss C. Efficacy of an experimental tin-F-containing solution in erosive tissue loss in enamel and dentine in situ. Caries Res. 2009a;43(6):415-21. doi: 10.1159/000252974.

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. 2009b May;54(5):432-6. doi: 10.1016/j.archoralbio.

Schlueter N, Hardt M, Lussi A, Engelmann F, Klimek J, Ganss C. Tin-containing fluoride solutions as anti-erosive agents in enamel: an in vitro tin-uptake, tissue-loss, and scanning electron micrograph study. Eur J Oral Sci. 2009c Aug;117(4):427-34. doi: 10.1111/j.1600-0722.2009.00647.x.

Schlueter N, Duran A, Klimek J, Ganss C. Investigation of the effect of various fluoride compounds and preparations thereof on erosive tissue loss in enamel in vitro. Caries Res. 2009d;43(1):10-6. doi: 10.1159/000189702.

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. 2009e Dec;37(12):944-8. doi: 10.1016/j.jdent.2009.07.010.

Schlueter N, Neutard L, von Hinckeldey J, Klimek J, Ganss C. Tin and fluoride as anti-erosive agents in enamel and dentine in vitro. Acta Odontol Scand. 2010 May;68(3):180-4. doi: 10.3109/00016350903555395. Epub 2010 Jan 25.

Schlueter N, Klimek J, Ganss C. Efficacy of tin-containing solutions on erosive mineral loss in enamel and dentine in situ. Clin Oral Investig. 2011 Jun;15(3):361-7. doi: 10.1007/s00784-010-0386-x.

Schlueter N, Jaeggi T, Lussi A. Is dental erosion really a problem? Adv Dent Res. 2012 Sep;24(2):68-71. doi: 10.1177/0022034512449836. Review.

Schlueter N, Klimek J, Ganss C. Randomised in situ study on the efficacy of a tin/chitosan toothpaste on erosive-abrasive enamel loss. Caries Res. 2013;47(6):574-81. doi: 10.1159/000351654. Epub 2013 Aug 17.

Schlueter N, Klimek J, Ganss C. Effect of a chitosan additive to a Sn2+-containing toothpaste on its anti-erosive/anti-abrasive efficacy--a controlled randomised in situ trial. Clin Oral Investig. 2014 Jan;18(1):107-15. doi: 10.1007/s00784-013-0941-3. Epub 2013 Feb 17.

Schlueter N, Lussi A, Tolle A, Ganss C. Effects of Erosion Protocol Design on Erosion/Abrasion Study Outcome and on Active Agent (NaF and SnF2) Efficacy. Caries Res. 2016;50(2):170-9. doi: 10.1159/000445169. Epub 2016 Apr 27.

Schweizer-Hirt CM, Schait A, Schmid R, Imfeld T, Lutz F, Mühlemann HR. [Erosion and abrasion of the dental enamel. Experimental study]. SSO Schweiz Monatsschr Zahnheilkd. 1978 May;88(5):497-529.

Seong J, Macdonald E, Newcombe RG, Davies M, Jones SB, Johnson S, West NX. In situ randomised trial to investigate the occluding properties of two desensitising toothpastes on dentine after subsequent acid challenge. Clin Oral Investig. 2013 Jan;17(1):195-203.

Shellis RP, Ganss C, Ren Y, Zero DT, Lussi A. Methodology and models in erosion research: discussion and conclusions. Caries Res. 2011;45 Suppl 1:69-77. doi: 10.1159/000325971.

Shellis RP, Barbour ME, Jesani A, Lussi A. Effects of buffering properties and undissociated acid concentration on dissolution of dental enamel in relation to pH and acid type. Caries Res. 2013;47(6):601-11. doi: 10.1159/000351641. Epub 2013 Sep 21.

Shellis RP, Addy M. The interactions between attrition, abrasion and erosion in tooth wear. Monogr Oral Sci. 2014;25:32-45. doi: 10.1159/000359936. Epub 2014 Jun 26. Review.

Shellis RP, Featherstone JD, Lussi A. Understanding the chemistry of dental erosion. Monogr Oral Sci. 2014;25:163-79. doi: 10.1159/000359943. Epub 2014 Jun 26. Review.

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

Siqueira WL, Custodio W, McDonald EE. New insights into the composition and functions of the acquired enamel pellicle. J Dent Res. 2012a Dec;91(12):1110-8. doi: 10.1177/0022034512462578.

Siqueira WL, Bakkal M, Xiao Y, Sutton JN, Mendes FM. Quantitative proteomic analysis of the effect of fluoride on the acquired enamel pellicle. PLoS One. 2012b;7(8):e42204. doi: 10.1371/journal.pone.0042204.

Skjørland KK, Rykke M, Sønju T. Rate of pellicle formation in vivo. Acta Odontol Scand. 1995 Dec;53(6):358-62.

Sönju T, Rölla G. Chemical analysis of the acquired pellicle formed in two hours on cleaned human teeth in vivo. Rate of formation and amino acid analysis. Caries Res. 1973;7(1):30-8.

Steiger-Ronay V, Tektas S, Attin T, Lussi A, Becker K, Wiedemeier DB, Beyeler B, Carvalho TS. Comparison of Profilometric and Microindentation Analyses for Determining the Impact of Saliva on the Abrasion of Initially Eroded Enamel. Caries Res. 2019;53(1):33-40. doi: 10.1159/000489133. Epub 2018 Jun 7.

Stenhagen KR, Hove LH, Holme B, Tveit AB. The effect of daily fluoride mouth rinsing on enamel erosive/abrasive wear in situ. Caries Res. 2013;47(1):2-8. doi: 10.1159/000342619. Epub 2012 Sep 21.

Stephen KW, McCrossan J, Mackenzie D, Macfarlane CB, Speirs CF. Factors determining the passage of drugs from blood into saliva. Br J Clin Pharmacol. 1980 Jan;9(1):51-5.

Sulkala M, Wahlgren J, Larmas M, Sorsa T, Teronen O, Salo T, Tjäderhane L. The effects of MMP inhibitors on human salivary MMP activity and caries progression in rats. J Dent Res. 2001 Jun;80(6):1545-9.

Sundaram G, Wilson R, Watson TF, Bartlett DW. Effect of resin coating on dentine compared to repeated topical applications of fluoride mouthwash after an abrasion and erosion wear regime. J Dent. 2007 Oct;35(10):814-8. Epub 2007 Sep 12.

Svendsen IE, Arnebrant T, Lindh L. Validation of mechanically-assisted sodium dodecyl-sulphate elution as a technique to remove pellicle protein components from human enamel. Biofouling. 2008;24(4):227-33. doi: 10.1080/08927010802018277.

ten Cate JM, Duijsters PP. Influence of fluoride in solution on tooth demineralization. I. Chemical data. Caries Res. 1983;17(3):193-9.

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

ten Cate JM. Review on fluoride, with special emphasis on calcium fluoride mechanisms in caries prevention. Eur J Oral Sci. 1997 Oct;105(5 Pt 2):461-5. Review.

ten Cate JM, Larsen MJ, Pearce EIF, Fejerskov O. Chemical interactions between the tooth and oral fluids. Em: Fejerskov O, Kidd EAM. Dental caries. The disease and its clinical management. Berlin: Blackwell Verlag, 2003 9-69. Turssi CP, Vianna LM, Hara AT, do Amaral FL, França FM, Basting RT. Counteractive effect of antacid suspensions on intrinsic dental erosion. Eur J Oral Sci. 2012 Aug;120(4):349-52. doi: 10.1111/j.1600-0722.2012.00972.x. Epub 2012 Jun 25.

Uhlen MM, Mulic A, Holme B, Tveit AB, Stenhagen KR. The Susceptibility to Dental Erosion Differs among Individuals. Caries Res. 2016;50(2):117-23. doi: 10.1159/000444400. Epub 2016 Mar 17.

Van Nieuw Amerongen A, Bolscher JG, Veerman EC. Salivary proteins: protective and diagnostic value in cariology? Caries Res. 2004 May-Jun;38(3):247-53. Review.

Vassilakos N, Rundegren J, Arnebrant T, Glantz PO. Adsorption from salivary fractions at solid/liquid and air/liquid interfaces. Arch Oral Biol. 1992a;37(7):549-57.

Vassilakos N, Arnebrant T, Rundegren J, Glantz PO. In vitro interactions of anionic and cationic surfactants with salivary fractions on well-defined solid surfaces. Acta Odontol Scand. 1992b Jun;50(3):179-88.

Veeregowda DH, van der Mei HC, Busscher HJ, Sharma PK. Influence of fluoride-detergent combinations on the visco-elasticity of adsorbed salivary protein films. Eur J Oral Sci. 2011 Feb;119(1):21-6. doi: 10.1111/j.1600-0722.2010.00798.x.

Vieira A, Ruben JL, Huysmans MC. Effect of titanium tetrafluoride, amine fluoride and fluoride varnish on enamel erosion in vitro. Caries Res. 2005 Sep-Oct;39(5):371-9.

Voronets J, Jaeggi T, Buergin W, Lussi A. Controlled toothbrush abrasion of softened human enamel. Caries Res. 2008;42(4):286-90. doi: 10.1159/000148160. Epub 2008 Jul 29.

Voronets J, Lussi A. Thickness of softened human enamel removed by toothbrush abrasion: an in vitro study. Clin Oral Investig. 2010 Jun;14(3):251-6. doi: 10.1007/s00784-009-0288-y. Epub 2009 Jun 5.

Vukosavljevic D, Custodio W, Buzalaf MA, Hara AT, Siqueira WL. Acquired pellicle as a modulator for dental erosion. Arch Oral Biol. 2014 Jun;59(6):631-8. doi: 10.1016/j.archoralbio.2014.02.002. Epub 2014 Feb 10. Review.

Wahlgren MC, Arnebrant T, Askendal A, Welin-Klinstr1MS The elutability of fibrinogen by sodium dodecyl sulphate and alkyltrimethyl-ammoniumbromides. Colloids Surf A Physicochem Eng Aspects 1993, 70:151–158

Wang X, Lussi A. Functional foods/ingredients on dental erosion. Eur J Nutr. 2012 Jul;51 Suppl 2:S39-48. doi: 10.1007/s00394-012-0326-4.

Weatherell JA, Deutsch D, Robinson C, Hallsworth AS. Assimilation of fluoride by enamel throughout the life of the tooth. Caries Res. 1977;11 Suppl 1:85-115. Review

Wegehaupt FJ, Tauböck TT, Stillhard A, Schmidlin PR, Attin T. Influence of extraand intra-oral application of CPP-ACP and fluoride on re-hardening of eroded enamel. Acta Odontol Scand. 2012 May;70(3):177-83. doi: 10.3109/00016357.2011.600713. Epub 2011 Jul 25.

Wei SH. Scanning electron microscope study of stannous fluoride-treated enamel surfaces. J Dent Res. 1974 Jan-Feb;53(1):57-63.

Welin-Klinstr MS, Askendal A, Elwing H. Surfactant and protein interactions on wettability gradient surfaces. J Colloid Interface Sci 1993, 158:188–194

West NX, Hughes JA, Addy M. Erosion of dentine and enamel in vitro by dietary acids: the effect of temperature, acid character, concentration and exposure time. J Oral Rehabil. 2000 Oct;27(10):875-80.

West NX, Hughes JA, Addy M. The effect of pH on the erosion of dentine and enamel by dietary acids in vitro. J Oral Rehabil. 2001 Sep;28(9):860-4.

West NX, Davies M, Amaechi BT. In vitro and in situ erosion models for evaluating tooth substance loss. Caries Res. 2011;45 Suppl 1:43-52. doi: 10.1159/000325945. Epub 2011 May 31. Review.

Wiegand A, Attin T. Influence of fluoride on the prevention of erosive lesions--a review. Oral Health Prev Dent. 2003;1(4):245-53.

Wiegand A, Attin T. Occupational dental erosion from exposure to acids: a review. Occup Med (Lond). 2007 May;57(3):169-76.

Wiegand A, Egert S, Attin T. Toothbrushing before or after an acidic challenge to minimize tooth wear? An in situ/ex vivo study. Am J Dent. 2008a Feb;21(1):13-6.

Wiegand A, Bliggenstorfer S, Magalhaes AC, Sener B, Attin T: Impact of the in situ formed salivary pellicle on enamel and dentine erosion induced by different acids. Acta Odontol Scand. 2008b; 66: 225–30.

Wiegand A, Bichsel D, Magalhães AC, Becker K, Attin T. Effect of sodium, amine and stannous fluoride at the same concentration and different pH on in vitro erosion. J Dent. 2009 Aug;37(8):591-5. doi: 10.1016/j.jdent.2009.03.020. Epub 2009 Apr 5.

Wiegand A, Hiestand B, Sener B, Magalhães AC, Roos M, Attin T. Effect of TiF4, ZrF4, HfF4 and AmF on erosion and erosion/abrasion of enamel and dentin in situ. Arch Oral Biol. 2010a Mar;55(3):223-8. doi: 10.1016/j.archoralbio.2009.11.007. Epub 2010 Jan 18.

Wiegand A, Magalhães AC, Navarro RS, Schmidlin PR, Rios D, Buzalaf MA, Attin T. Effect of titanium tetrafluoride and amine fluoride treatment combined with carbon dioxide laser irradiation on enamel and dentin erosion. Photomed Laser Surg. 2010b Apr;28(2):219-26. doi: 10.1089/pho.2009.2551.

Wiegand A, Attin T. Design of erosion/abrasion studies--insights and rational concepts. Caries Res. 2011;45 Suppl 1:53-9. doi: 10.1159/000325946.

Young WG, Khan F. Sites of dental erosion are saliva-dependent. J Oral Rehabil. 2002 Jan;29(1):35-43.

Yu H, Wegehaupt FJ, Zaruba M, Becker K, Roos M, Attin T, Wiegand A. Erosion-inhibiting potential of a stannous chloride-containing fluoride solution under acid flow conditions in vitro. Arch Oral Biol. 2010a Sep;55(9):702-5. doi: 10.1016/j.archoralbio.2010.06.006.

Yu H, Attin T, Wiegand A, Buchalla W. Effects of various fluoride solutions on enamel erosion in vitro. Caries Res. 2010b;44(4):390-401. doi: 10.1159/000316539. Epub 2010 Aug 10.

Zahradnik RT, Moreno EC, Burke EJ. Effect of salivary pellicle on enamel subsurface demineralization in vitro. J Dent Res. 1976 Jul-Aug;55(4):664-70.

Zahradnik RT, Moreno EC. Progressive stages of subsurface demineralization of human tooth enamel. Arch Oral Biol. 1977;22(10-11):585-91.

Zahradnik RT. Modification by salivary pellicles of in vitro enamel remineralization. J Dent Res. 1979 Nov;58(11):2066-73.

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

Zero DT, Lussi A. Erosion--chemical and biological factors of importance to the dental practitioner. Int Dent J. 2005;55(4 Suppl 1):285-90.

Zero DT, Lussi A. Behavioral factors. Monogr Oral Sci. 2006;20:100-5. Review.

APÊNDICE A - Instruções gerais aos participantes da pesquisa

INSTRUÇÕES AOS VOLUNTÁRIOS

Primeiramente, obrigada por ter aceitado ser voluntário deste in situ! Sua participação é mais do que fundamental para o desenvolvimento da minha tese, então muito obrigada!

Vamos começar explicando em que consiste sua participação (instruções gerais):

- A fase experimental *in situ* terá duração total de 32 dias, sendo 3 semanas de experimento, intercaladas de 1 semana de descanso, em que o aparelho não será utilizado;
- Você deverá realizar devidamente os procedimentos instruídos durante as 3 fases experimentais de 5 dias:
 - o 27 a 31/08/2018;
 - o 10 a 14/09/2018;
 - o 24 a 28/09/2018;
- Em dias previamente combinados, você deverá comparecer na FOUSP para recebimento de novo kit de pesquisa;
- O seu kit in situ contém:
 - √ Nécessaire térmica
 - ✓ Caixa contendo o aparelho com as amostras
 - ✓ Garrafa com ácido cítrico
 - ✓ Pote para imersão extra oral do aparelho em ácido cítrico
 - ✓ Caixa de lenços
 - ✓ Garrafa com a solução experimental + dosador para bochecho da solução
 - ✓ Frasco conta-gotas com a solução para remoção da película adquirida
 - ✓ Frasco com água destilada
 - ✓ Gaze estéril
 - ✓ Kit de higiene bucal (estojo, escova com capinha, dentifrício, fio dental)

- ✓ Cronograma da semana
- ✓ Caneta
- ✓ Timer
- ✓ Chocolatinho motivacional;)
- O aparelho deverá ser utilizado por aproximadamente 7 horas, devendo ser armazenado na caixa sobre a gaze umedecida com água destilada (que foi fornecido no kit da pesquisa) em geladeira durante a noite;
- Antes de qualquer refeição e/ou lanche e/ou ingestão de bebidas, remova o aparelho da boca e coloque-o na caixa sobre a gaze umedecida com água destilada;
- Você poderá beber APENAS ÁGUA com o aparelho em boca;
- Após a ingestão de alimentos e bebidas (exceto água) entre as refeições principais, enxágue a boca com água corrente e aguarde 15 minutos antes de colocar novamente o aparelho na boca;
- Realize a higienização dos dentes naturais normalmente 3x/dia (após café da manhã, almoço e antes de dormir) com a escova de dente, creme dental e fio dental fornecidos pela pesquisadora;
- A porção interna do aparelho, que fica em contato com a mandíbula, poderá ser escovada com a mesma escova de dente e creme dental fornecidos no kit de higiene oral diária;
- N\u00e3o escove a superf\u00edcie que cont\u00e9m os fragmentos de esmalte dental, e evite tamb\u00e9m, que o creme dental entre em contato com as amostras;
- Durante o experimento, interrompa o uso de qualquer enxaguatório bucal;
- Durante o experimento, você não deverá fazer uso de qualquer medicação sistêmica. Caso seja necessário, avisar à pesquisadora;
- Caso você tenha algum desconforto ou alguma dúvida sobre os procedimentos durante o experimento, me comunique imediatamente pelo telefone: (11) 97206-9972 (Vivo) ou pelo email: camila.vieira.silva@usp.br;

 Sua colaboração de extrema importância para o bom andamento deste experimento. Os horários e número de imersões na solução de ácido cítrico e nas soluções experimentais, bem como o uso ininterrupto do aparelho, são essenciais para que a pesquisa forneça resultados confiáveis;

AGRADEÇO IMENSAMENTE SUA COLABORAÇÃO E DISPONIBILIDADE, E ESTOU À DISPOSIÇÃO PARA QUAISQUER ESCLARECIMENTOS.

Camila Vieira da Silva

Instruções para esta semana:

- Você deverá inicialmente inserir o dispositivo intra-oral e aguardar, com ele em boca, um período de 2 horas.
- Após estas 2 horas, apenas no aparelho do lado direito, aplicar 5 gotas da solução para remover película (frasco conta-gotas âmbar) sobre as 2 amostras e lavar com água destilada, secar levemente e reinserir o aparelho direito em boca. Aguardar 30 min.
- Após 30 minutos, proporcionar o ácido cítrico no potinho e imergir os dois lados do aparelho por 5 minutos. Secar levemente com o lenço e reinserir na boca (1ª imersão em ácido)
- Após 1 hora e 30 minutos, imergir os dois lados do aparelho em ácido cítrico. Repetir 3 vezes, em intervalos de 1h30min (total de 4 imersões em ácido cítrico diárias)
- Após a última imersão em ácido, aguardar 30 min em boca, e armazenar o aparelho em gaze umedecida na caixa até o dia seguinte.

Horário		Horá	rio Reali	zado		
sugerido	Segunda (17/09)	Terça (18/09)	Quarta (19/09)	Quinta (20/09)	Sexta (21/09)	PROCEDIMENTO
08:00						Inserção do aparelho em boca
10:00						Aplicação de 5 gotas do removedor de película apenas nas amostras do lado direito
10:30						1ª imersão em ácido cítrico (5 min)
12:00						2ª imersão em ácido cítrico (5 min)
13:30						3ª imersão em ácido cítrico (5 min)
15:00						4ª imersão em ácido cítrico (5 min)
15:30						Armazenamento do aparelho em gaze umedecida com água destilada em geladeira.

- Após cada imersão na solução experimental e em ácido cítrico, o excesso de solução deve ser removido através de secagem leve e cuidadosa em papel absorvente.
- Os horários do cronograma são sugestões, porém os intervalos propostos devem ser seguidos corretamente para garantir resultados confiáveis. Os horários que os procedimentos foram efetivamente realizados deverão ser anotados.

APÊNDICE C – Instruções semanais aos participantes da pesquisa, de acordo com o grupo experimental: solução antes da primeira erosão diária

Instruções para esta semana:

- Você deverá inicialmente inserir o dispositivo intra-oral e aguardar, com ele em boca, um período de 2 horas.
- Após estas 2 horas, apenas no aparelho do lado direito, aplicar 5 gotas da solução para remover película (frasco conta-gotas âmbar) sobre as 2 amostras, lavar com água destilada, secar levemente e reinserir o aparelho em boca. Em seguida, proporcionar a solução no dosador e fazer bochecho por 30 segundos, prestando atenção para bochechar dos dois lados. Aguardar 30 min.
- Após 30 minutos, proporcionar o ácido cítrico no potinho e imergir os dois lados do aparelho por 5 minutos. Secar levemente com o lenço e reinserir na boca (1ª imersão em ácido)
- Após 1 hora e 30 minutos, imergir os dois lados do aparelho em ácido cítrico. Repetir 3 vezes, em intervalos de 1h30min (total de 4 imersões em ácido cítrico diárias)
- Após a última imersão em ácido, aguardar 30 min em boca, e armazenar o aparelho em gaze umedecida na caixa até o dia seguinte.

Horário		Horá	rio Realiz	ado		
sugerido	Segunda	Terça	Quarta	Quinta	Sexta	PROCEDIMENTO
Sugeriuo	(10/09)	(11/09)	(12/09)	(13/09)	(14/09)	
08:00						Inserção do aparelho em boca
10:00						Aplicação de 5 gotas do removedor de película apenas nas amostras
10.00						do lado direito. Seguido do bochecho com a solução.
10:30						1ª imersão em ácido cítrico (5 min)
12:00						2ª imersão em ácido cítrico (5 min)
13:30						3ª imersão em ácido cítrico (5 min)
15:00						4ª imersão em ácido cítrico (5 min)
15:30						Armazenamento do aparelho em gaze umedecida com água destilada
15.50						em geladeira.

- Após cada imersão na solução experimental e em ácido cítrico, o excesso de solução deve ser removido através de secagem leve e cuidadosa em papel absorvente.
- Os horários do cronograma são sugestões, porém os intervalos propostos devem ser seguidos corretamente para garantir resultados confiáveis. Os horários que os procedimentos foram efetivamente realizados deverão ser anotados.

APÊNDICE D – Instruções semanais aos participantes da pesquisa, de acordo com o grupo experimental: solução após a primeira erosão diária

Instruções para esta semana:

- Você deverá inicialmente inserir o dispositivo intra-oral e aguardar, com ele em boca, um período de 2 horas.
- Após estas 2 horas, proporcionar o ácido cítrico no potinho e imergir os dois lados do aparelho por 5 minutos. Secar levemente com o lenço e reinserir na boca (1ª imersão em ácido). Aguardar 30 min.
- Após 30 minutos, apenas no aparelho do lado direito, aplicar 5 gotas da solução para remover película (frasco conta-gotas âmbar) sobre as 2 amostras, lavar com água destilada, secar levemente e reinserir o aparelho em boca. Em seguida, proporcionar a solução no dosador e fazer bochecho por 30 segundos, prestando atenção para bochechar dos dois lados. Aguardar 30 min.
- Após 30 minutos, imergir os dois lados do aparelho em ácido cítrico por 5 min. Repetir 2 vezes, em intervalos de 1h30min (total de 4 imersões em ácido cítrico diárias)
- Após a última imersão em ácido, aguardar 30 min em boca, e armazenar o aparelho em gaze umedecida na caixa até o dia seguinte.

Horário	Horário Realizado		Horário Realizado			
sugerido	Segunda (10/09)	Terça (11/09)	Quarta (12/09)	Quinta (13/09)	Sexta (14/09)	PROCEDIMENTO
08:00	(10/00)	(11/00)	(12/03)	(10/00)	(14700)	Inserção do aparelho em boca
10:00						1ª imersão em ácido cítrico (5 min)
10:30						Aplicação de 5 gotas do removedor de película apenas nas amostras do lado direito. Seguido do bochecho com a solução.
11:00						2ª imersão em ácido cítrico (5 min)
12:30						3ª imersão em ácido cítrico (5 min)
14:00						4ª imersão em ácido cítrico (5 min)
14:30						Armazenamento do aparelho em gaze umedecida com água destilada em geladeira.

- Após cada imersão na solução experimental e em ácido cítrico, o excesso de solução deve ser removido através de secagem leve e cuidadosa em papel absorvente.
- Os horários do cronograma são sugestões, porém os intervalos propostos devem ser seguidos corretamente para garantir resultados confiáveis. Os horários que os procedimentos foram efetivamente realizados deverão ser anotados.

ANEXO A - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da etapa in vitro



FACULDADE DE ODONTOLOGIA DA UNIVERSIDADE DE SÃO



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Titulo da Pesquisa; Comparação das metodologias in situ para formação de lesão de erosão em esmaite

dental humano

Pegguicador: CAMILA VIEIRA DA SILVA

Área Temática: Versão: 1

CAAE: 55818316.3.0000.0075

Instituição Proponente: Universidade de Sao Paulo Patropinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1,556,090

Aprecentação do Projeto:

No presente estudo in situ, 10 voluntários participarão deste estudo cruzado, dividido em 2 fases de 5 dias cada, os quais utilizarão um dispositivo

removivei inferior bilateral, posicionado na região vestibular de prê-molares e molares (Macdonald et al., 2010; Olley et al., 2012; Seong et al., 2013),

contendo 02 fragmentos de esmalte dental humano (duplicata), dos quals será obtida uma média dos valores de perfilometria para análise

estatistica.

As unidades experimentais serão compostas por 40 fragmentos de esmaite dental humano, obtidos a partir de superfícies lisas dos dentes humanos.

As amostras serão selecionadas através de análise da curvatura por perfilometria e de dureza superficial por microdureza superficial (t0).

As amostras divididas em dois grupos experimentais (n=10), de acordo com as ciciagens erosivas propostas, que consistem em: G1 - 6 imersões de

2 minutos em ácido cítrico a 0,5%, pH 2,3, em intervalos de 1,5h; G2 – 3 imersões de 5 minutos em 1% de ácido cítrico, pH 2,3, em intervalos de

1,5h.

Enderago: Av Prof Lineu Prestes 2227

Bairro: Cidade Universitária CEP: 05.506-900

UF: SP Municipie: SAO PAULO

Telefone: (11)3091-7980 Fax: (11)3091-7814 E-mail: cepts@usp.br





Continuação do Pareser: 1,556,090

Para que todos os voluntários sejam submetidos as duas ciclagens, o estudo será realizado seguindo um modelo cross-over, e com um periodo de

wash-out de 10 dias entre os tratamentos.

A variável de resposta será a perda de tecido mineral (em m), analisada de forma quantitativa, por meio de teste de perfilometria óptica.

Objetivo da Pesquisa:

Considerando a necessidade padronização nos procedimentos experimentais a fim de simular as condições que ocorrem na cavidade bucal durante os desaflos erosivos, este estudo tem como objetivo obter um protocolo simplificado de erosão in situ em esmaite dental humano que simule uma lesão erosiva avançada.

Availação dos Riscos e Beneficios:

Fdscos:

Os voluntários poderão sentir um leve desconforto pelo uso do aparelho removivel, que é, entretanto, semelhante ao desconforto causado por um aparelho ortodôntico môvel, mas que será minimizado com o ajuste criterioso do dispositivo.

Reneficios:

Beneficios: Os resultados desta pesquisa contribuirão para um maior conhecimento sobre o tema abordado no meio científico, sem beneficio direto para você. Clinicamente, pacientes com predisposição à erosão dental ou com sinais clinicos de erosão poderão ser beneficiados com os avanços das pesquisas nesta área.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa está desenhada de forma correta.

Conciderações cobre os Termos de apresentação obrigatória:

- No TCLE faitou informar o telefone do pesquisador responsável.
- Não encontrel o cronograma

os demais termos obrigatórios foram apresentados de forma apropriada:

- Folha de rosto
- Declaração do Biobanco da FOUSP que fornecerá as 20 amostras de material biológico de terceiros molares
- Projeto de pesquisa

_

Enderago: Av Prof Lineu Prestes 2227

Bairro: Cidade Universitária CEP: 08.508-000 UF: SP Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3091-7980 Fax: (11)3091-7814 E-mail: cepfo@usp.br





Continuação do Parecer: 1.555.090

Recomendações:

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados ao CEP-FOUSP relatórios parciais anuais referentes ao andamento da pesquisa e relatório final, utilizando-se da opção "Enviar Notificação" (descrita no Manuai "Submeter Notificação", disponível na Central de Suporte - canto superior direito do site www.saude.gov.br/plataformabrasil).

Qualquer alteração no projeto original deve ser apresentada "emenda" a este CEP, de forma objetiva e com justificativas para nova apreciação.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há pendências.

Considerações Finais a oritério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P	05/05/2016		Acetto
do Projeto	ROJETO_697576.pdf	15:58:30		
TCLE / Termos de	TCLE_versao_final.pdf	05/05/2016	CAMILA VIEIRA DA	Acelto
Assentimento /		15:58:09	SILVA	
Justificativa de				
Auséncia				
Folha de Rosto	Folha_Rosto_Camila_Vieira.pdf	20/04/2016	CAMILA VIEIRA DA	Acetto
		10:03:02	SILVA	
Declaração de	Declaração_Blobanco.pdf	14/04/2016	CAMILA VIEIRA DA	Acelto
Manuselo Material		15:50:28	SILVA	
Biológico /				
Biorepositório /				
Blobanco				
Projeto Detalhado /	Projeto_de_Pesquisa_Camila_Vieira.pdf	14/04/2016	CAMILA VIEIRA DA	Acelto
Brochura		11:13:14	SILVA	
Investigador				

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Enderago: Av Prof Lineu Prestes 2227

Bainto: Cidade Universitária GEP: 05.508-900

UF: SP Municipio: SAO PAULO

Telefone: (11)3091-7950 Fax: (11)3091-7814 E-mail: cspfb@usp.br





Continuação do Parecer: 1,586,090

SAO PAULO, 20 de Maio de 2016

Assinado por: Décio dos Santos Pinto Junior (Coordenador)

Enderego: Av Prof Lineu Prestes 2227
Bairro: Oldede Untversibiris
UF: SP Municipio: SAO PAULO
Telefone: (11)3091-7950 Fax: (11)3 OEP: 05.508-900

Fax: (11)3091-7814 E-mail: cspfb@usp.br

ANEXO B - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da etapa in situ



FACULDADE DE ODONTOLOGIA DA UNIVERSIDADE DE SÃO



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Titulo da Pesquisa: Influência da película adquirida no potencial da solução de AmF/NaF/SnCi2 em

controlar a progressão da lesão de erosão no esmalte dental humano

Pegguicador: CAMILA VIEIRA DA SILVA

Area Temática: Versão: 1

CAAE: 56166216.9.0000.0075

Instituição Proponente: Universidade de Sao Paulo Patropinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1,556,128

Aprecentação do Projeto:

No presente estudo in situ, 12 voluntários serão divididos aleatoriamente em quatro grupos experimentais de 05 dias cada, os quais utilizarão um

dispositivo removivei inferior bilateral, posicionado na região vestibular de prê-molares e molares (Macdonald et al., 2010; Olley et al., 2012; Seong

et al., 2013), contendo 02 fragmentos de esmaite dental humano (duplicata), dos quais será obtida uma média dos valores de perfilometria para

análise estatistica.

As unidades experimentais serão compostas por 96 fragmentos de esmaite dental humano, obtidos a partir de superficies livres dos dentes

humanos. As amostras serão selecionadas através de análise da curvatura por perfilometria e de dureza superficial por microdureza superficial (t0).

As amostras divididas em 04 grupos experimentais (n=12), de acordo com o protocolo de tratamento com as soluções controle e experimental.

- G1 água destilada aplicada previamente à ciclagem erosiva diária, logo após a formação da película adquirida:
- G2 água destilada aplicada ao final da ciclagem erosiva dária;

Enderego: Av Prof Lineu Prestes 2227

Bainto: Cidade Universitária CEP: 05.505-900

UF: SP Municipie: SAO PAULO

Telefone: (11)3091-7960 Faz: (11)3091-7814 E-mail: cepfo@usp.br





Continuação do Parecer: 1,586,126

- G3 solução de AmF/NaF/SnCI2 aplicada previamente à ciclagem erosiva diária;
- G4 -.solução de AmF/NaF/8nCl2 aplicada ao final da ciclagem erosiva diária.

Para que não haja influencia de possível efeito residual dos tratamentos, o estudo será realizado seguindo um modelo crossover, e haverá um

período de wash-out de 10 días entre os tratamentos. Ao final do experimento, todos os voluntários serão submetidos a todos os tratamentos.

A variável de resposta será a perda de tecido mineral (em m), analisada de forma quantitativa, por meio de teste de perfilometria óptica.

Objetivo da Pesquisa:

avaliar se a pelicula adquirida formada in situ interfere na eficácia da solução de AmF/NaF/8nCl2 na proteção do esmaite dental humano frente a desaflos erosivos. A hipótese nula testada é que a pelicula adquirida não interfere na eficácia da solução de AmF/NaF/8nCl2 na inibição da progressão da erosão dental.

Availação dos Riscos e Beneficios:

Riscos:

Os voluntários poderão sentir um leve desconforto pelo uso do aparelho removivel, que é, entretanto, semelhante ao desconforto causado por um aparelho ortodôntico môvel, mas que será minimizado com o ajuste criterioso do dispositivo.

Beneficios:

Os resultados desta pesquisa contribuirão para um maior conhecimento sobre o tema abordado no meio científico, sem beneficio direto para você. Clinicamente, pacientes com predisposição à erosão dental ou com sinais clínicos de erosão poderão ser beneficiados com os avanços das pesquisas nesta área.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

o desenho do estudo é apropriado

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

termos apresentados:

- Folha de rosto
- Autorização do Biobanco da FOUSP para fomecer 48 amostras material biológico terceiros molares
- Projeto
- Cronograma

Enderago: Av Prof Lineu Prestes 2227

Bairro: Cidade Universitária CEP: 05.508-900

UF: SP Municipie: SAO PAULO

Telefone: (11)3091-7950 Fax: (11)3091-7814 E-mail: cepfo@usp.br





Continuação do Parecer: 1,556,126

-TCLE

Recomendações:

Tendo em vista a legisiação vigente, devem ser encaminhados ao CEP-FOUSP relatórios parciais anuais referentes ao andamento da pesquisa e relatório final, utilizando-se da opção "Enviar Notificação" (descrita no Manuai "Submeter Notificação", disponível na Central de Suporte - canto superior direito do site www.saude.gov.briplataformabrasil).

Qualquer alteração no projeto original deve ser apresentada "emenda" a este CEP, de forma objetiva e com Justificativas para nova apreciação.

Concluções ou Pendências e Lista de inadequações:

Não há pendências.

Considerações Finais a oritério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P ROJETO 706689.pdf	17/05/2016 08:32:18		Acetto
Folha de Rosto	FolhadeRosto.pdf	17/05/2016 08:31:56	CAMILA VIEIRA DA SILVA	Acetto
Declaração de Manuselo Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	Declaracao_Biobanco.pdf	05/05/2016 16:14:59	CAMILA VIEIRA DA SILVA	Acetto
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	05/05/2016 16:11:26	CAMILA VIEIRA DA SILVA	Acetto
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Camila_Vieira_FAPESP.pdf	05/05/2016 11:43:29	CAMILA VIEIRA DA SILVA	Acelto

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Enderego: Av Prof Lineu Prestes 2227

Bairro: Cidade Universitária CEP: 05.508-000

UF: SP Municipio: SAO PAULO

Telefone: (11)3091-7960 Fax: (11)3091-7814 E-mail: cspfb@usp.br





Continuação do Parecer: 1,556,128

SAO PAULO, 20 de Maio de 2016

Assinado por: Décio dos Santos Pinto Junior (Coordenador)

Enderego: Av Prof Lineu Prestes 2227
Bairro: Cidade Universitària
UF: SP Municipio: SAO PAULO
Telefone: (11)3091-7950 Fax: (11)X OEP: 05,508-900

Fax: (11)3091-7814 E-mail: capib@usp.br