

**Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul**

**Instituto de Geriatria e Gerontologia**

**Programa de Pós-Graduação em Gerontologia Biomédica**

**Curso de Mestrado**

Dissertação:

Avaliação *in vitro* e *in vivo* do potencial do vinho tinto como agente causal e da saliva como agente modificador de erosões dentárias

Fernando Neves Hugo

Agosto, 2002.

**Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul**

**Instituto de Geriatria e Gerontologia**

**Programa de Pós-Graduação em Gerontologia Biomédica**

**Curso de Mestrado**

Fernando Neves Hugo

*Avaliação in vitro e in vivo do Potencial do Vinho Tinto como agente causal e da saliva como agente modificador de erosões dentárias*

Dissertação apresentada como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau de Mestre em Gerontologia Biomédica.

Orientadora: Professora Doutora Dalva Maria Pereira Padilha

Agosto, 2002.

## **DEDICATÓRIA**

Aos meus pais, Gilberto e Maria

## AGRADECIMENTOS

Ao Gilberto, à Cristina pelo carinho e apoio indispensáveis em todos os momentos e por estarem sempre presentes;

À Alzira e à Leonor pelas incontáveis vezes em que colaboraram para que eu chegasse até aqui;

À Juliana, pelo carinho e pela cumplicidade e também pelas sempre bem-vindas críticas ao meu trabalho;

À Professora Doutora Dalva Maria Pereira Padilha, pela oportunidade única e por acreditar nas minhas idéias malucas ao mesmo tempo em que me mostrava o curso com segurança;

À Professora Doutora Maria Antonieta Lopes de Souza pela chance de realizar o estágio docente junto à sua disciplina, e pelas várias lições de ensino, presteza, capacidade e correção e pela atenção dispensada;

Ao Professor Doutor Emílio Antônio Jeckel-Neto, pelo empenho na resolução dos problemas e pela cessão do Laboratório de Biologia do Envelhecimento, sem cuja estrutura teria sido impossível concluir este estudo;

À Professora Doutora Anna Christina de Medeiros Fossatti, pelos conselhos na elaboração do projeto que deu origem a esta dissertação;

Ao colega José Miguel Amenábar, pela amizade e por compartilhar comigo das aventuras que enfrentamos para que chegássemos até este momento;

Aos colegas Júlio Baldisserotto e Maurício Hammes, pela amizade e pelo companheirismo ao longo destes dois anos;

À equipe do Laboratório de Biologia do Envelhecimento do IPB-PUCRS, em especial à Raquel Mattos de Oliveira, pela presteza e colaboração indispensáveis;

À equipe do Centro de Microscopia e Microanálises da PUCRS, pela capacitação técnica que possibilitou a realização das microscopias eletrônicas de varredura;

À equipe do Biotério da Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde, pelo apoio sem o qual não teríamos conseguido;

Ao Professor Doutor Ângelo José Gonçalves Bós, pela cuidadosa revisão desta dissertação;

À Ana Carolina Corso, ao Samuel Corso, ao Felipe Salgado e ao Júlio Sanfelice, por acordarem aos Sábados pela manhã nas datas mais absurdas para colaborarem com a realização do experimento;

Aos meus familiares que de um modo ou outro contribuíram para que eu alcançasse este objetivo;

Ao Juarez e à Janete Hilgert, por me receberem em sua casa como parte de sua família;

Ao Honório e ao Guilherme Franco, pela paciência incomparável com os orientandos insistentes da Professora Dalva;

Aos amigos Aurélio Salaverry, Ralf Priesnitz Simch e Stavros Georgiadis, por terem conduzido as coisas na clínica ao longo destes dois anos sem nunca criticar minhas ausências;

A todas aquelas pessoas que de maneira direta ou indireta colaboraram para o desenvolvimento desta dissertação;

À CAPES, pelo auxílio-bolsa.

## SUMÁRIO

<b>1. RESUMO</b>	<b>12</b>
<b>2. ABSTRACT</b>	<b>13</b>
<b>3. INTRODUÇÃO</b>	<b>14</b>
<b>4. REFERENCIAL TEÓRICO</b>	<b>16</b>
<b>4.1. Conceito de Erosão Dentária</b>	<b>16</b>
<b>4.2. Patogênese das Erosões Dentárias</b>	<b>16</b>
<b>4.3. Etiologia das Erosões Dentárias</b>	<b>16</b>
<b>4.4. Evidências Obtidas a partir de Experimentos de Erosão Dentária <i>In Vitro</i></b>	<b>17</b>
<b>4.5. Evidências Obtidas a partir de Experimentos de Erosão Dentária em Roedores</b>	<b>17</b>
<b>4.6. Evidências Obtidas a partir de Relatos de Casos e Estudos Observacionais de Erosão Dentária</b>	<b>18</b>
<b>4.7. Vinho, Saúde e Erosão Dentária</b>	<b>19</b>
<b>4.8. A Saliva e seus Derivados como Modificadores de Erosões Dentárias</b>	<b>21</b>
<b>4.8.1. Película Salivar</b>	<b>21</b>
<b>4.8.2. Fluxo Salivar</b>	<b>22</b>
<b>4.9. Fator Tempo e Erosão Dentária</b>	<b>22</b>
<b>4.10. Ética</b>	<b>23</b>
<b>5. OBJETIVOS</b>	<b>24</b>
<b>5.1. Objetivo Geral</b>	<b>24</b>
<b>5.2. Objetivos Específicos</b>	<b>24</b>
<b>6. ARTIGO 1</b>	<b>25</b>

<b>6.1. PRELIMINARES</b>	<b>26</b>
<b>6.1.1. Cabeçalho</b>	<b>26</b>
<b>6.1.2. Referência Bibliográfica</b>	<b>26</b>
<b>6.1.3. Resumo</b>	<b>26</b>
<b>6.1.4. Unitermos</b>	<b>27</b>
<b>6.2. TEXTO</b>	<b>27</b>
<b>6.2.1. Introdução</b>	<b>27</b>
6.2.1.1. Conceito de erosão dentária	28
6.2.1.2. Etiopatogênese das erosões dentárias	28
6.2.1.3. O papel da saliva e da película salivar nas erosões dentárias	29
6.2.1.4. Erosões dentárias e o vinho	29
<b>6.2.2. Material e Métodos</b>	<b>29</b>
<b>6.2.3. Resultados</b>	<b>31</b>
<b>6.2.4. Discussão</b>	<b>31</b>
<b>6.2.5. Conclusões</b>	<b>33</b>
<b>6.2.6. Agradecimentos</b>	<b>33</b>
<b>6.3. MATERIAL DE REFERÊNCIA</b>	<b>33</b>
<b>6.3.1. Referência Bibliográfica do Artigo</b>	<b>33</b>
<b>6.3.2. Abstract</b>	<b>33</b>
<b>6.3.3. Uniterms</b>	<b>34</b>
<b>6.3.4 Referências Bibliográficas</b>	<b>34</b>
<b>6.3.5 Endereço</b>	<b>36</b>
<b>Figura 1</b>	<b>38</b>
<b>Figura 2</b>	<b>38</b>
<b>Figura 3</b>	<b>39</b>
<b>Figura 4</b>	<b>39</b>
<b>Figura 5</b>	<b>40</b>

<b>Figura 6</b>	<b>40</b>
<b>7. ARTIGO 2</b>	<b>41</b>
<b>7.1. PRELIMINARES</b>	<b>42</b>
<b>7.1.1 Cabeçalho</b>	<b>42</b>
<b>7.1.2. Referência Bibliográfica</b>	<b>42</b>
<b>7.1.3. Resumo</b>	<b>42</b>
<b>7.1.4. Unitermos</b>	<b>43</b>
<b>7.2. TEXTO</b>	<b>43</b>
<b>7.2.1. Introdução</b>	<b>43</b>
7.2.1.1. Conceituação e etiopatogênese das erosões dentárias	43
7.2.1.2. Roedores como modelo para investigação de erosões dentárias	44
7.2.1.3. Confiabilidade em dados contínuos	44
<b>7.2.2. Material e Métodos</b>	<b>45</b>
7.2.2.1. Animais e dieta	45
7.2.2.2. Processamento das amostras	46
7.2.2.3. Análise das amostras	47
7.2.2.4. Análise estatística	47
<b>7.2.3. Resultados</b>	<b>48</b>
<b>7.2.4. Discussão</b>	<b>49</b>
<b>7.2.5. Conclusões</b>	<b>52</b>
<b>7.2.6. Agradecimentos</b>	<b>53</b>
<b>7.3. MATERIAL DE REFERÊNCIA</b>	<b>53</b>
<b>7.3.1. Referência Bibliográfica do artigo</b>	<b>53</b>
<b>7.3.2. Abstract</b>	<b>53</b>
<b>7.3.3. Uniterms</b>	<b>54</b>
<b>7.3.4. Referências Bibliográficas</b>	<b>54</b>

<b>7.3.5. Endereço</b>	<b>55</b>
<b>Tabela 1</b>	<b>56</b>
<b>Tabela 2</b>	<b>57</b>
<b>Tabela 3</b>	<b>58</b>
<b>Tabela 4</b>	<b>59</b>
<b>Tabela 5</b>	<b>60</b>
<b>Figura 1</b>	<b>61</b>
<b>Gráfico 1</b>	<b>62</b>
<b>Gráfico 2</b>	<b>63</b>
<b>Gráfico 3</b>	<b>64</b>
<b>Gráfico 4</b>	<b>65</b>
<b>Gráfico 5</b>	<b>66</b>
<b>8. ARTIGO 3</b>	<b>67</b>
<b>8.1. PRELIMINARES</b>	<b>68</b>
<b>8.1.1. Cabeçalho</b>	<b>68</b>
<b>8.1.2. Referência Bibliográfica</b>	<b>68</b>
<b>8.1.3. Resumo</b>	<b>68</b>
<b>8.1.4. Unitermos</b>	<b>69</b>
<b>8.2. TEXTO</b>	<b>69</b>
<b>8.2.1. Introdução</b>	<b>69</b>
8.2.1.1. Conceituação	<b>69</b>
8.2.1.2. Etiopatogênese das erosões dentárias	<b>69</b>
8.2.1.3. Agentes causais e modificadores das erosões dentárias	<b>70</b>
8.2.1.4. Saliva como modificadora de erosão dentária	<b>70</b>
8.2.1.5. Vinho e erosão dentária	<b>71</b>
8.2.1.6. Evidências obtidas de modelos animais	<b>71</b>
8.2.1.7. Erosões dentárias e envelhecimento	<b>72</b>
<b>8.2.2. Material e Métodos</b>	<b>72</b>

	10
8.2.2.1. Animais e dieta	72
8.2.2.2. Cronograma do experimento	73
8.2.2.3. Sulfato de atropina	74
8.2.2.4. Processamento e análise das amostras	74
8.2.2.5. Análise estatística	75
<b>8.2.3. Resultados</b>	<b>76</b>
8.2.3.1. Confiabilidade	76
8.2.3.2. pH dos líquidos	76
8.2.3.3. Peso e consumo de líquido	77
8.2.3.4. Medições de área	77
8.2.3.5. Área intacta	78
8.2.3.6. Área de erosão em esmalte	78
8.2.3.7. Área de erosão em dentina	79
8.2.3.8. Área total	79
<b>8.2.4. Discussão</b>	<b>79</b>
<b>8.2.5. Conclusões</b>	<b>83</b>
<b>8.2.6. Agradecimentos</b>	<b>83</b>
<b>8.3. MATERIAL DE REFERÊNCIA</b>	<b>83</b>
8.3.1. Referência Bibliográfica do Artigo	83
8.3.2. Abstract	84
8.3.3. Uniterms	84
8.3.4. Referências Bibliográficas	84
8.3.5. Endereço	89
<b>Tabela 1</b>	<b>90</b>
<b>Tabela 2</b>	<b>91</b>
<b>Tabela 3</b>	<b>92</b>
<b>Tabela 4</b>	<b>93</b>
<b>Gráfico 1</b>	<b>94</b>
<b>Figura 1</b>	<b>95</b>
<b>Figura 2</b>	<b>95</b>

	11
<b>9. RESULTADOS PRINCIPAIS</b>	<b>96</b>
<b>9.1. Artigo 1</b>	<b>96</b>
<b>9.2. Artigo 2</b>	<b>96</b>
<b>9.3. Artigo 3</b>	<b>97</b>
<b>10. NOTAS FINAIS</b>	<b>98</b>
<b>11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>100</b>

## 1. RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar o papel do vinho tinto (agente causal) e da saliva (agente modificador) no desenvolvimento de erosões dentárias. Para tal foram realizados três experimentos, apresentados na forma de artigos nesta dissertação. No **Artigo 1** verificou-se o potencial erosivo *in vitro* do vinho tinto sobre o esmalte bovino. Blocos de esmalte foram imersos em saliva humana ou água por 12 horas e após no vinho por 1 hora, e processados para microscopia eletrônica de varredura. Os espécimes foram investigados para que se detectassem mudanças na superfície do esmalte neste modelo. O espectro do efeito erosivo foi similar nas amostras, e o esmalte imerso em vinho tinto por uma hora sofreu erosão importante, enquanto a saliva não protegeu a superfície do esmalte. No **Artigo 2**, foi conduzido um experimento para desenvolver um método de quantificação de erosão dentária em roedores e avaliar sua confiabilidade. Para tal foram utilizados 60 animais nos grupos: controle (água) e teste (vinho), dos quais as hemi-mandíbulas foram removidas e fotografadas sob aumento para análise das variáveis (áreas): Total, Intacta, Erosão em Esmalte, Erosão em Dentina e Total de Erosão. A abordagem estatística foi a proposta por Bland e Altman para verificação da confiabilidade de dados contínuos. Os resultados mostraram boa precisão das medições no primeiro molar nas variáveis (áreas): Intacta, Erosão em Esmalte, Erosão em Dentina e Total e, portanto recomenda-se seu uso quando da aplicação do método. No **Artigo 3**, 60 animais que consumiram água, água e atropina, vinho ou vinho e atropina foram mortos em diferentes períodos do experimento, para que se verificasse o papel do vinho tinto e da supressão da secreção salivar com atropina sobre o desenvolvimento de erosão dentária. O método utilizado foi o proposto no **Artigo 2**. O efeito erosivo do vinho tinto testado foi significativo, assim como o da saliva, que apesar de discreto, também foi importante.

## 2. ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the role of red wine (causative agent) and saliva (modifying agent) in the development of dental erosion. In order to achieve these three experiments, presented as part of this dissertation, were performed. On **Paper 1** *in vitro* erosive potential of red wine over bovine enamel was tested. Enamel blocks were immersed in human saliva or water for 12 hours, then in wine for 1 hour, and finally processed for scanning electron microscopy. The specimens were investigated to detect any changes in the enamel surface. The spectrum of the erosive effect was similar for both groups/samples. Immersion of the enamel for 1H in red wine produced important erosion and saliva did not protect superficial enamel. **Paper 2** was conducted in order to develop and evaluate the reliability of a method to quantify dental erosion in rodents. To achieve those aims 60 mice, divided into two groups control (water) and test (wine) had their hemi-mandibles removed and photographed under magnification for the analysis of the following variables (areas): Total, Intact, Enamel Erosion, Dentin Erosion, and Total Erosion. The statistical approach used in this study was the proposed by Bland and Altman for reliability analysis of quantitative data. Results showed good precision of the measurements in the first molar for the following variables (areas): Intact, Enamel Erosion, Dentin Erosion and Total. We then recommend the use of those if this method is used. On **Paper 3**, 60 animals consuming water, water + atropine, wine or wine + atropine were killed in different periods of the experiment in order to verify the role of wine and pharmacological suppression of saliva with atropine on the development of dental erosion. The method used was that proposed on **Paper 2**. The erosive effect of the wine was significant as was the role of saliva, that despite discrete, was important.

### 3. INTRODUÇÃO

Evidências indicam que o desenvolvimento das erosões dentárias está associado a um agente causal, seja ele de origem intrínseca ou extrínseca, que é o componente ácido. O papel de fatores modificadores de doença é bem documentado e reconhecido, dando sustentação ao modelo de doença multifatorial atualmente proposto para diversas patologias crônico-degenerativas. Há, porém, poucas evidências sobre o papel de diversos agentes causais, fatores modificadores e moduladores no desenvolvimento das erosões dentárias, tanto *in vitro* como, principalmente, *in vivo*.

Entre os fatores causais de erosão dentária tem sido dada especial atenção para as bebidas consumidas preferentemente por crianças e adolescentes, como é o caso dos sucos de fruta, dos refrigerantes e das bebidas isotônicas<sup>1, 2, 3, 4, 5, 6</sup> e o seu potencial erosivo. Entretanto, pouco esforço foi realizado para que se verifique o potencial erosivo das bebidas alcoólicas consumidas por adultos e por idosos, como é o caso do vinho<sup>7, 8, 9</sup> da cerveja<sup>10</sup> e dos destilados. Além disso, há que se considerar que a quantidade de evidência clínica e científica ligando um alimento ou bebida em particular como agente etiológico primário de erosão dentária é limitada<sup>11</sup>.

Entre os possíveis fatores modificadores da suscetibilidade e progressão das erosões dentárias está a saliva. Até o presente momento, porém, nenhum estudo experimental de erosão dentária em animais verificou se há associação entre fluxo salivar diminuído e erosões dentárias<sup>4, 6, 12, 13</sup>. Apenas estudos de cárie experimental observaram o papel significativo de uma redução do fluxo salivar sobre o aumento do número de lesões<sup>14, 15</sup>. Entretanto, algumas escassas evidências de estudos realizados em humanos mostram que a presença e a severidade de erosões dentárias estão associadas a um fluxo salivar baixo<sup>16, 9, 17</sup>. As evidências obtidas a partir de estudos experimentais<sup>18, 19, 20</sup> dão suporte ao papel significativo da película salivar formada tanto *in vitro* como *in situ* na proteção do esmalte a desmineralização.

O tempo age como um importante fator modulador das erosões dentárias. Evidências de experimentos *in vitro* indicam que a progressão de desmineralização dentária é praticamente linear com o passar do tempo<sup>21, 22</sup>. Dados epidemiológicos também dão suporte a esta importância, indicando que quanto maior o tempo de exposição a um agente causal,

como o vinho <sup>9</sup>, ou idade do indivíduo <sup>23</sup>, maior a prevalência e a severidade de erosões dentárias encontradas.

O acesso ao flúor e a medidas preventivas de combate às cáries resultará num aumento significativo no número médio de dentes por indivíduo, inclusive entre as faixas etárias mais elevadas da população <sup>24</sup>. Há uma percepção geral de que os desgastes dentários, como abrasão, atrição e erosão, estão aumentando devido à associação entre a permanência dos dentes em boca por períodos mais prolongados e os componentes da dieta moderna, como os ácidos utilizados na constituição e conservação de alimentos industrializados. Mas, apesar da importância da dieta na etiologia dos desgastes dentários ser reconhecida, ela é pouco entendida. Um desgaste dentário severo em idosos pode impor restrições dietéticas com conseqüências na ingestão de alimentos e status nutricional, e faz destes, como as erosões dentárias, um problema de crescente preocupação <sup>25</sup>.

Estas observações justificam o delineamento de pesquisas que permitam uma melhor compreensão de uma série de fatores causais, entre os quais os diferentes alimentos que compõe a dieta e ácidos do ambiente de trabalho; modificadores de doença, como saliva e seus derivados, consistência de dieta e uso de fármacos, por exemplo; e moduladores de doença como o tempo (envelhecimento), na suscetibilidade e desenvolvimento de erosões dentárias.

## 4. REFERENCIAL TEÓRICO

### 4.1. Conceito de Erosão Dentária.

Erosão deriva do verbo latim *erodere, erosi, erosum* (corroer) e descreve o processo de destruição gradual da face de algo, geralmente por processos eletrolíticos ou químicos<sup>26</sup>. O termo clínico erosão dentária é utilizado para descrever os resultados físicos de uma perda crônica, patológica e localizada do tecido mineralizado das faces dentárias por meio de contato com ácido ou queilação, sem envolvimento bacteriano. O agente causal é, geralmente, um ácido<sup>27,28</sup>.

### 4.2. Patogênese das Erosões Dentárias.

As lesões de erosão na superfície de esmalte ocorrem devido à desmineralização causada por líquidos subsaturados em relação a hidróxido e a fluorapatita, cuja cinética de dissolução está relacionada a reações controladas pelo grau de difusibilidade dos ácidos em solução. As bebidas ácidas, portanto, estão diretamente relacionadas com o processo erosivo na medida que são frequentemente subsaturados em relação a hidróxido e a fluorapatita<sup>29</sup>.

Como característica micromorfológica de erosão no esmalte dentário observam-se claramente as zonas de união entre os prismas quando este é exposto a ácidos. Já as erosões na dentina iniciam-se nas áreas peritubulares densamente mineralizadas, que são as preferentemente dissolvidas pelo contato com ácidos<sup>30</sup>. Após apenas 5 minutos de exposição *in vitro* de dentes humanos a ácido cítrico 1% já se observam, por meio de microscopia eletrônica de varredura, mudanças na superfície do esmalte. Com o aumento do tempo de exposição ao ácido, aumentam as mudanças, tornando-se visíveis áreas de estrutura prismática, devido à perda da camada de esmalte aprismático superficial. Essas mudanças progridem gradualmente, até que toda a camada de esmalte aprismático superficial do dente seja removida pela ação do ácido<sup>31</sup>.

### 4.3. Etiologia das Erosões Dentárias.

As erosões dentárias são denominadas extrínsecas, intrínsecas ou idiopáticas, levando-se em consideração que, a partir da realização de uma anamnese, pode-se verificar a origem dos ácidos que a causam e que podem ser exógenos, endógenos ou desconhecidos <sup>26</sup>.

As erosões extrínsecas são resultado de ácidos exógenos. Estes podem ser ácidos que contaminam o ar do ambiente, resultado do uso de medicamentos, ou ácidos oriundos da dieta, que são a causa mais comum de erosão dentária. Os alimentos ácidos mais consumidos são as frutas cítricas e outras frutas frescas que contém ácido fosfórico; sucos de frutas; refrigerantes e bebidas ácidas em geral <sup>26</sup>. Mais recentemente ácido ascórbico (vitamina C) presente nas mais variadas bebidas, além de bebidas isotônicas, doces <sup>26</sup>, colutórios <sup>32</sup> e aspirina em pó <sup>33</sup>, entre outros, foram identificados como agentes causais significativos de erosão dentária.

As erosões intrínsecas são resultado de ácidos endógenos, como os que compõem o suco gástrico. Estes, quando em contato com os dentes, devido a vômitos recorrentes, regurgitação ou refluxo, causam erosões dentárias <sup>26</sup>. Entre as causas mais comuns de regurgitação ou vômitos estão as desordens alimentares de origem psicossomática como anorexia e bulimia; e as causas de origem somática como gravidez, alcoolismo, tratamento para o alcoolismo, e desordens gastrintestinais <sup>26, 34</sup>. As erosões idiopáticas são resultado da ação de ácidos de origem desconhecida <sup>26</sup>.

#### **4.4. Evidências Obtidas a partir de Experimentos de Erosão Dentária *In Vitro*.**

Estudos *in vitro* examinaram a associação entre diferentes fatores causais e erosão do esmalte por meio de diferentes métodos como: microdureza superficial, microscopia eletrônica de varredura, perfilometria e estereomicroscopia <sup>35</sup>. De modo geral, os resultados destes experimentos indicam que componentes da dieta, entre os quais já foram identificados: sucos naturais e industrializados de laranja, limão, maçã, toranja; sucos em pó de limão; refrigerantes de limão, laranja e cola; bebidas alcoólicas como o vinho; bebidas isotônicas; colutórios; e aspirina <sup>3, 18, 32, 33, 36, 37, 38, 39</sup>, entre outros, são capazes de provocar erosão, nos modelos testados.

#### **4.5. Evidências Obtidas a partir de Experimentos de Erosão Dentária em Roedores.**

Alguns estudos, a partir da primeira metade do século XX, utilizaram roedores como modelo experimental para investigação do potencial erosivo de alimentos ácidos<sup>40, 41, 42, 43</sup>. Os métodos utilizados para avaliação consistiram na atribuição de escores pré-definidos de destruição aos molares dos animais testados. Entretanto, o uso e a interpretação de seus resultados são limitados pela qualidade do dado que fornece.

Mais recentemente, em um estudo realizado em ratos, Sorvari<sup>6</sup> avaliou o efeito de bebidas isotônicas sobre cárie e erosão dentária. A pesquisadora observou que essas bebidas provocaram marcada erosão dentária nas faces linguais dos molares mandibulares dos animais e que a adição de flúor a estas soluções resultou em efeito preventivo tanto no desenvolvimento de cárie como no de erosão dentária<sup>6</sup>. Utilizando o mesmo protocolo de pesquisa, Sorvari et al 1996<sup>13</sup> avaliaram os molares de ratos por meio de microscopia eletrônica de varredura. Os resultados deste experimento são similares aos do anterior, dando suporte ao papel erosivo de bebidas esportivas e ao potencial de proteção proporcionado pelo flúor, neste modelo experimental<sup>13</sup>.

O potencial erosivo de um refrigerante de laranja, suco de laranja e suco de maçã foi avaliado por Mistry e Grenby<sup>4</sup>, em um estudo experimental com ratos. Os pesquisadores observaram que as áreas de erosão dentária dos animais que consumiram os sucos ou o refrigerante por seis semanas foram significativamente maiores do que as áreas de erosão dos animais que faziam parte de um grupo controle<sup>4</sup>, indicando o potencial erosivo das bebidas testadas nesse modelo.

#### **4.6. Evidências Obtidas a partir de Relatos de Casos e Estudos Observacionais de Erosão Dentária.**

Em diversos relatos de casos clínicos onde havia diagnóstico de erosões dentárias este foi associado ao consumo de quantidades expressivas de produtos de baixo pH como suco de frutas cítricas (laranja e limão), vitamina C mastigável e bebidas alcoólicas<sup>1, 7, 44</sup> como o vinho<sup>39</sup>.

Em uma série de casos<sup>27</sup> erosões dentárias foram associadas aos seguintes fatores causais: consumo de frutas e de suco de frutas em grande quantidade, e regurgitação gástrica,

quando associada ao consumo excessivo de frutas e suco de frutas <sup>27</sup>. Num estudo de frequência, indivíduos cuja dieta era composta por 95% ou mais de alimentos crus apresentaram um número significativamente maior de erosões dentárias do que voluntários de um grupo controle, indicando que o consumo de alimentos crus está associado a uma maior chance de erosões dentárias quando comparado ao consumo de uma dieta convencional <sup>45</sup>.

Em outro estudo observacional <sup>17</sup>, a frequência de erosões em indivíduos cuja dieta era lactovegetariana foi significativamente maior do que em indivíduos de um grupo controle. Nesse estudo, regressão linear múltipla revelou que os principais fatores que afetaram as erosões dentárias foram o fluxo salivar e o consumo de vinagre, de conservas de vinagre e de frutas silvestres ácidas <sup>17</sup>.

A prevalência de erosões dentárias foi examinada em um estudo Suíço, com uma amostra de indivíduos selecionados aleatoriamente e separados em dois grupos de diferentes faixas etárias. As faces dentárias foram utilizadas como unidade de análise. Foi observada uma prevalência maior de erosões para todas essas faces dentárias examinadas no grupo de faixa etária mais elevada. Neste mesmo grupo foram observados: um número significativamente maior de dentes afetados por pessoa e uma maior severidade das erosões, com mais dentes apresentando dentina exposta neste do que no grupo de indivíduos mais jovens. Observou-se também que o consumo de dieta ácida influenciou significativamente a presença de lesões de face vestibular. Já nas faces linguais as erosões foram associadas aos vômitos crônicos. Nas faces oclusais, as variáveis associadas foram idade, consumo de frutas cítricas e suco de frutas <sup>23</sup>.

Os fatores de risco para erosão dentária foram investigados por Jarvinen et al <sup>16</sup>, que enfatizaram a contribuição quantitativa de cada um dos fatores avaliados no desenvolvimento de erosões dentárias. Neste estudo o risco para desenvolvimento de erosões dentárias foi associado ao consumo de frutas cítricas mais de duas vezes por dia, ao consumo de refrigerantes uma vez por dia ou mais, e ao consumo diário de bebidas esportivas. O risco de erosão também foi alto quando havia sintomas gástricos, vômitos crônicos e naqueles onde o fluxo salivar estimulado era baixo <sup>16</sup>.

#### **4.7. Vinho, Saúde e Erosão Dentária.**

Recentemente a idéia de que o consumo regular de bebidas alcoólicas protege contra doenças cardiovasculares foi disseminada entre a população em geral. Diversos estudos observacionais têm atribuído um efeito protetor ao consumo moderado de álcool contra aterosclerose e morbimortalidade. Um efeito adicional, segundo estudos de coorte, tem sido observado quando o álcool é consumido na forma de vinho. Entre os prováveis mecanismos desta proteção pelo consumo de álcool estão a modulação que causa aumento dos níveis de colesterol HDL, a resposta bifásica na pressão sanguínea, modulação da função endotelial, e inibição da agregação plaquetária, tudo isto sem que se cause aumento de peso nem desequilíbrio na homeostase glicose-insulina. Por fim, estas evidências de estudos populacionais apontam que o consumo de álcool, numa quantidade compatível com uma ou duas doses, resulta em uma redução estimada entre 20 e 40% nos eventos cardiovasculares <sup>46, 47</sup>.

O vinho tinto, especificamente, parece ter um efeito protetor devido à presença de agentes antioxidantes. Sabe-se, a partir de evidências obtidas em estudos *in vitro*, que ele inibe a oxidação de lipoproteínas de baixa densidade, aumenta a capacidade antioxidativa e reduz a capacidade de peroxidação lipídica do plasma de humanos. Apesar dos diversos efeitos favoráveis não há evidência, entretanto que justifique a prescrição de álcool para prevenção de doenças cardiovasculares <sup>46, 47</sup>.

O potencial erosivo *in vitro* de vinho branco, de tinto e de um vinho de cereja foi avaliado por meio de microscopia eletrônica de varredura, da medição do pH e da capacidade tampão, além do conteúdo de fosfato pré e pós-imersão de blocos de esmalte dentário. Todos os vinhos testados apresentaram baixo pH e capacidade tampão. Ao microscópio eletrônico, observou-se erosão severa em todos os blocos de esmalte avaliados, com a característica de favos de mel da estrutura prismática do esmalte aparente. Estes achados foram interpretados pelos autores como indicativos do significativo potencial erosivo dos vinhos testados. Quanto à liberação de fosfato pelos blocos de esmalte imersos nos vinhos, observou-se um aumento linear em função do tempo de exposição <sup>38</sup>.

Gray et al <sup>39</sup> relatam um caso de erosões dentárias severas, com lesões localizadas nas margens cervicais dos dentes, em um provador de vinhos que há dez anos atuava como profissional. Neste mesmo estudo também foi verificado o potencial erosivo *in vitro* de um vinho branco sobre a superfície de esmalte que foi previamente imerso e analisado por meio

de microscopia eletrônica de varredura. As fotomicrografias mostraram áreas com desmineralização irregular da superfície do esmalte, indicativas de erosão, quando comparadas com áreas de dentes que foram imersos apenas em água, mostrando o potencial erosivo do vinho branco neste sistema *in vitro* <sup>39</sup>.

Erosão dentária mostrou-se um risco ocupacional para provadores de vinhos profissionais avaliados num estudo de prevalência Sueco. A prevalência de erosões dentárias nesses indivíduos foi muito alta, devido à frequência de exposição aos vinhos. A severidade de dano aos dentes observada foi associada ao número de anos que os indivíduos estavam empregados como provadores de vinho e com a presença de um baixo fluxo salivar não estimulado <sup>9</sup>.

#### **4.8. A Saliva e seus Derivados como Modificadores de Erosões Dentárias.**

A saliva exerce várias funções de proteção contra a erosão dentária. Entre elas estão: capacidade de neutralização; os sistemas tampão; capacidade de manter supersaturação pela presença de cálcio e fosfato; a formação da película salivar, que tem a capacidade de proteger a superfície do esmalte de desmineralização; e a presença de cálcio, fosfato e fluoretos, fundamentais nos processos de remineralização <sup>34</sup>.

##### **4.8.1. Película Salivar.**

Alguns estudos *in vitro* avaliaram a relação entre desmineralização da superfície do esmalte e a formação de película salivar. Maupomé et al <sup>18</sup> avaliaram o efeito erosivo de um refrigerante tipo cola sobre blocos de esmalte humano incubados com saliva coletada de doadores. Os autores observaram que a microdureza superficial do esmalte foi modificada pelo tipo de agitação a que estes blocos foram submetidos, pelo nível de exposição (baixo, médio e alto), e pelo tipo de saliva utilizada (total ou clarificada). Os blocos imersos em saliva clarificada tiveram uma microdureza superficial menor do que os imersos em saliva total. Hannig e Baltz <sup>19</sup> examinaram o efeito protetor da película salivar formada *in vivo* sobre o esmalte atacado com ácido cítrico em diferentes concentrações. Análise de imagens de microscopia eletrônica de varredura mostraram que as modificações na superfície do esmalte foram menores nas amostras sobre as quais foi formada película salivar do que sobre as amostras controle, onde não houve formação de película. Também foi realizado teste de

microdureza superficial e nas amostras em que houve formação de película salivar houve uma microdureza maior do que nas amostras sem a película. Os resultados destes estudos, quando analisados em conjunto, indicam que a película salivar deve ter algum efeito protetor sobre o esmalte exposto a ácidos *in vitro* <sup>19</sup>.

#### **4.8.2. Fluxo Salivar.**

Os estudos conduzidos em animais de laboratório cujo fluxo salivar estava diminuído limitaram-se a analisar a relação entre a doença cárie e a hipossalivação. Nestes experimentos os animais que foram submetidos a farmacoterapia ou cujas glândulas salivares ligadas tiveram números significativamente maiores de cáries quando comparados aos números de animais controle, resultado do efeito protetor da saliva sobre o esmalte dentário atacado por ácido <sup>14, 15, 48</sup>.

Apesar de as evidências até o presente momento suportarem, como já descrito no parágrafo anterior, uma relação entre a presença de doença cárie e hipossalivação em animais submetidos a farmacoterapia cujo efeito secundário é supressão da produção de saliva não há evidência na literatura, até o presente momento, da relação entre as erosões dentárias e a presença de fluxo salivar diminuído pelo consumo de fármaco.

Nos estudos observacionais de erosões dentárias onde foram avaliados parâmetros salivares, observou-se associação significativa entre fluxo salivar estimulado e não estimulado baixos, capacidade tampão da saliva baixa; e um aumento da frequência/prevalência e severidade das lesões de erosão dentária <sup>9, 16, 17</sup>.

#### **4.9. Fator Tempo e Erosão Dentária.**

Alguns estudos *in vitro* examinaram o papel do tempo no desenvolvimento de erosões dentárias. Um experimento onde se avaliou a erosão do esmalte por meio de perfilometria revelou que há um padrão linear de perda mineral com o passar do tempo em espécimes de esmalte atacados por ácido <sup>49</sup>. Zhang e cols <sup>50</sup>, também utilizando perfilometria como método, avaliaram longitudinalmente as modificações da superfície do esmalte desmineralizado com ácido acético por um período de cinco dias. Os resultados deste estudo também mostram um padrão linear de erosão dentária com o passar do tempo, com um aumento linear na

rugosidade do esmalte até aproximadamente 70 horas de exposição ao ácido, período após qual a desmineralização progrediu de maneira errática<sup>50</sup>. Na dentina, também há indicações de que, com o tempo há uma progressão linear na desmineralização<sup>22</sup>.

A prevalência e a severidade de erosões dentárias foram associadas às erosões dentárias em um estudo realizado com provadores de vinho suecos. Nos provadores cujo tempo de atuação profissional era maior, maior era a prevalência e a severidade das lesões encontradas. Noutro estudo de prevalência, em que os indivíduos foram divididos em grupos de duas faixas etárias foi observada uma maior prevalência entre aqueles que estavam no grupo cuja idade era maior. Estes estudos observacionais dão suporte para papel do tempo na frequência/prevalência e severidade de erosões dentárias<sup>9,23</sup>.

#### **4.10. Ética.**

Muitos alimentos e bebidas consumidos pelo homem podem ter efeitos destrutivos sobre os dentes. Evidências de relatos de casos e estudos observacionais têm indicado um aumento na prevalência de erosões dentárias. Há então uma necessidade de se descobrir que bebidas, por exemplo, podem estar entre as responsáveis<sup>51</sup>. A realização de estudos experimentais diretos sobre erosões dentárias em humanos apresenta limitações éticas, devido à etiologia das lesões de erosão dentária, que são de característica destrutiva e irreversível. Portanto, o emprego de animais de laboratório em estudos de erosão dentária estaria justificado como alternativa viável para a realização desses estudos experimentais *in vivo*<sup>4,51</sup>.

## 5. OBJETIVOS

### 5.1. Objetivo Geral

O objetivo deste estudo foi avaliar o papel do vinho tinto (agente causal), da saliva e da película salivar (agentes modificadores) no desenvolvimento de erosões dentárias.

### 5.2. Objetivos Específicos

Descrever o efeito erosivo *in vitro* de um vinho tinto brasileiro sobre o esmalte bovino previamente imerso em saliva humana e água.

Desenvolver um método experimental para quantificação de erosões dentárias em roedores.

Avaliar a confiabilidade deste método experimental para quantificação de erosões dentárias em roedores.

Avaliar o desenvolvimento de erosões dentárias em camundongos velhos submetidos ao consumo de vinho e fármaco cujo efeito secundário é supressão da secreção salivar.

## 6. ARTIGO 1

HUGO F. N., SOUZA M. A. L. de, PADILHA D. M. P. Efeito erosivo *in vitro* de um vinho tinto brasileiro sobre o esmalte bovino.

A formatação do artigo está de acordo com as instruções para autores da Revista Pesquisa Odontológica Brasileira, publicação da Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica e da Universidade de São Paulo, que está indexada nas bases de dados: LILACS, Bibliografia Brasileira de Odontologia, Biological Abstract, Index Medicus, Index to Dental Literature, MEDLARS, Medline, PubMed, The Serials Directory e Ulrich's.

## 6.1.PRELIMINARIES

### 6.1.1. Heading.

*In vitro* erosive effect of a Brazilian red wine on bovine enamel.

Potencial erosivo *in vitro* de um vinho tinto brasileiro sobre esmalte bovino.

Fernando Neves HUGO<sup>1</sup>, Maria Antonieta Lopes de SOUZA<sup>2</sup>, Dalva Maria Pereira PADILHA<sup>3</sup>.

### 6.1.2. Bibliographic Reference.

HUGO F. N., SOUZA M. A. L. de, PADILHA D. M. P. *In vitro* erosive effect of a Brazilian red wine on bovine enamel.

### 6.1.3. Abstract.

The consumption of wine is associated with development of dental erosion. The aim of this study was to describe erosive effect of a Brazilian red wine on bovine enamel previously immersed in human saliva and water. Enamel blocks were cut with diamond saw, rinsed in distilled water, sonicated, dried and the cutting surfaces and half of enamel surface were covered with nail varnish. Half of specimens were maintained in water and the rest immersed in human whole saliva during 12 hours. After that they were rinsed and immersed in wine during one hour, rinsed again and sonicated in acetone, washed and left to dry. They were mounted in stubs and gold sputtered for scanning electron microscopy. The wine pH was measured starting experiment. The specimens were investigated under low and high magnification following the nail varnish border to detect changes in enamel surface. Both

---

<sup>1</sup> Cell Aging Laboratory, Institute of Biomedical Research, PUCRS.

<sup>2</sup> Faculty of Biosciences and Faculty of Dentistry, PUCRS.

<sup>3</sup> Biomedical Gerontology, Institute of Geriatrics and Gerontology, PUCRS; Faculty of Dentistry, UFRGS.

groups showed no differences in the erosive aspects occurring in enamel blocks immersed previously in water or saliva. The spectrum of erosive effects in both groups was very similar. Few erosive effects were observed in some blocks where only physiological enamel scratches became wider. When the erosion was more pronounced scratches disappeared. In specimens severely eroded it was possible to recognize the honeycomb aspect of enamel prisms that sometimes were narrow but others wide. The wine pH was 4,55. It was concluded that bovine enamel immersed in red wine with pH 4,55 during one hour was eroded. In the conditions of this experiment, saliva did not protect enamel surface.

#### **6.1.4. Uniterms.**

Dental enamel, Microscopy, scanning, electron, Saliva, Tooth erosion, Wine.

## **6.2. TEXT**

### **6.2.1. Introduction.**

The idea that the regular consumption of alcoholic beverages is a healthy habit and protects against cardiovascular disease is spread among the population. Several television programs and advertisements have claimed that regular consumption of moderate amounts of alcoholic beverages, specially wine, are related with to health benefits. That information is supported by the results of several observational studies where moderate consumption of alcohol, in particular red wine, is associated with a protective effect against atherosclerosis and cardiovascular morbidity and mortality <sup>1, 2</sup>. In spite of those favorable effects there is no evidence in the literature that justifies the prescription of alcohol to prevent cardiovascular diseases <sup>1</sup>.

Other effects besides cardiovascular protection have been ascribed to wine. Some studies have conferred to it the potential to produce tooth erosion. Evidences of a case report <sup>3</sup> and from a prevalence <sup>4</sup> survey suggest that wine has a significant role as causative agent of

tooth erosion in professional wine tasters, and also that the development of those lesions are an occupational risk to them. Other evidence obtained from *in vitro* experiments<sup>5, 6</sup> show wine as an agent with significant erosive potential, supporting its role in tooth demineralization process.

#### 6.2.1.1. Definition of tooth erosion.

The clinical term dental erosion is used to describe the physical effects of a localized, chronic and pathological loss of mineral tissue that is chemically etched from the tooth surface by means of acid or chelation, without bacterial involvement<sup>7, 8</sup>.

#### 6.2.1.2. Etiopathogenesis of tooth erosion.

The role of acids as causative agents of tooth erosion is supported by several *in vitro* and *in vivo* studies. The acids are intrinsic when they proceed, for example, from gastric juice in individuals with gastro esophageal reflux; extrinsic when the source of the acids is, for example, the diet; and idiopathic, when the acids acting as causative agents of tooth erosion are from an unknown source<sup>7</sup>.

Evidences from *in vitro* experiments suggest that among the acids present in our diet industrialized and natural juices, soft drinks, beverages, beer, wine and also medicines such as aspirin and mouthwashes could act as significant erosive agents<sup>4, 5, 9, 10, 11, 12, 13, 14</sup>.

The erosive lesions in the surface of enamel occur due to a demineralization caused by hydroxi and fluorapatite subsaturated liquids. Acid beverages like soft drinks and fruit juices, wine, beer and spirits are directly related with erosive processes, because they are usually subsaturated in relation to hydroxi and fluorapatite<sup>15</sup>.

When exposed to acids due to an erosive challenge the junction zones among the prisms are clearly observable on enamel surface within the micro morphological aspect. Dentin erosion/demineralization process starts in the peritubular areas, which are preferably dissolved after contact with acids due to its higher degree of mineralization.<sup>16</sup> After only five minutes of *in vitro* exposure of human enamel to citric acid 1% clear changes, observed under scanning electron microscopy, occur on enamel surface. With increasing time of exposure of

enamel to acid further changes are observed, becoming visible areas of prismatic structures, due to loss of the aprismatic sheet of the superficial enamel. These changes progress gradually until all aprismatic sheet is removed through the acid action <sup>17</sup>.

#### 6.2.1.3. The role of saliva and salivary pellicle on tooth erosion.

Saliva exerts several functions of protection against tooth erosion. Among them are its neutralizing ability to dilute and clear acids in the mouth, its buffering systems neutralizing acids, its ability to maintain super saturation due to the presence of calcium and phosphate, the formation of salivary pellicle that protects the surface of enamel against tooth demineralization and the presence of calcium, phosphate and fluoride essential in remineralization processes <sup>8</sup>.

#### 6.2.1.4. Tooth erosion and wine.

Some authors have investigated the role of wine as erosive agent. Independently of the quality of evidence the results of these studies point to a significant potential of several types of wine as causative agents in tooth demineralization/erosion. *In vitro* experiments have shown that white, red and cherry wines are capable of causing important demineralization of the enamel surface <sup>4, 5, 6</sup> and root dentin <sup>4</sup>, and that phosphate release from enamel blocks progresses in a linear manner with time <sup>6</sup>.

There is also evidence from a case report and a prevalence study where tooth erosion was associated to wine tasting by professional wine tasters <sup>3, 5</sup>. Severity of erosion was associated, in the prevalence survey, to time as a professional wine taster and to a low unstimulated salivary flow <sup>3</sup>.

It was the aim of this experiment to describe the erosive effect of a popular Brazilian red wine on bovine enamel previously immersed in human saliva and water.

### 6.2.2. Material and Methods.

The approach used in this experiment in order to verify the erosive potential of red wine consisted in; measurement of the wine pH, represented by the mean value of three measurements (HI98103 Checker<sup>®</sup> 1, Hanna Instruments) performed in different moments; and description of the micro morphological aspect of bovine enamel due to acid exposure/erosion with the help of scanning electron microscopy (XL30, Phillips).

Enamel blocks were obtained after cutting eight bovine incisors with a diamond saw in a hard tissue-cutting table<sup>18</sup>. The specimens, measuring approximately 3X3X3 mm (9 mm<sup>2</sup> in the buccal surface), were removed from the central part of the buccal aspect of the teeth. All blocks with cracks or grooves after carefully inspection under a surgical microscope (M900, DFVasconcellos) were discarded from the experiment. Twenty specimens resulting from this procedure were washed with distilled water and stored in plastic vessels until starting experiment.

These twenty enamel specimens had all their surfaces, except for a half of the buccal side, covered with nail varnish. After, the blocks were randomly assigned to the following groups: **control**, composed by ten enamel blocks stored in distilled water; and **test**, composed by ten blocks immersed for twelve hours in unstimulated human saliva collected from a healthy donor at 25°C.

Before immersion in wine the blocks were carefully washed with distilled water. After that they were immersed in individual plastic vessels containing 25 ml of red wine (Vinho tinto seco Garibaldi, Cooperativa Vinícola Garibaldi) each for a period of one hour. When the immersion period was completed the blocks were removed from the plastic vessels and washed with distilled water, sonicated with acetone for twenty seconds to remove nail varnish, washed again with distilled water and dehydrated in ethanol 100% baths for twelve hours. After that the enamel blocks were let dry in room temperature (approximately 25° C) for at least twenty-four hours.

The specimens were mounted in metallic stubs and gold sputtered for observation under a scanning electron microscope (XL 30, Phillips). Enamel blocks were investigated under low and high magnification along the nail varnish border (limit between the area protected and the area exposed to red wine) to detect any changes on enamel surface. Zones

covered by varnish represented control region and zones uncovered represented the experimental region in each one of the specimens investigated in this experiment.

The criterion defining presence of mild erosion was the existence of detectable differences between the areas previously protected and exposed to wine in the enamel blocks. Presence of moderate erosion was marked by the dissolution of aprismatic enamel. Severe erosion was present when the surface of enamel progressively took the appearance of honeycomb, characteristic of prismatic enamel and typical of a significant enamel demineralization.

### **6.2.3. Results.**

The mean pH of red wine used in this experiment was 4,55. No difference was observed in the aspects of enamel erosion between the blocks previously immersed in distilled water (control) and human saliva (test). The spectrum of erosive effects in both groups was very similar. Few erosive effects were observed in some blocks (Figure 1, Figure 2) where only physiological enamel scratches became wider (Figure 3). When erosion was more pronounced scratches disappeared. In specimens severely eroded it was possible to recognize the honeycomb aspect of enamel prisms that sometimes were narrow (Figure 4) but others wide (Figure 5, Figure 6). Immersion of the bovine enamel blocks in red wine was able, both in saliva and water groups, of causing significant erosion/demineralization of superficial enamel as can be readily observed in the photomicrographs. There was no difference in the pattern and severity of erosion observed in both groups and therefore in the conditions of this experiment saliva did not seem to protect enamel surface from acid demineralization due to wine exposure.

### **6.2.4. Discussion.**

Enamel erosion/demineralization is an event clearly observable on the enamel blocks evaluated in this experiment. It is possible to recognize in the photomicrographs of the enamel blocks areas where severe erosion of the superficial enamel is present after only one hour of exposure to wine in both groups. Those findings are supported, guarding the differences

among experimental protocols, by other studies that used *in vitro* approaches<sup>4, 5, 6</sup> to assess erosive potential of different types of wines, and that observed significant demineralization of enamel and root dentin exposed to it.

The pH of the wine used in this experiment (4,55) was lower than the critical pH for enamel dissolution (5,5)<sup>13</sup>. These findings indicate the significance of the wine used in this experiment as an agent with ability to act as an erosive agent. If we consider that alcoholic drinks like wine are generally subsaturated in respect to hydroxi and fluorapatite contents when compared with enamel<sup>15</sup> the erosive effect observed on enamel surface in this experiment is justified.

Erosions observed in the enamel blocks evaluated exhibit, as dominant characteristic, the exposure of enamel prisms revealing the honeycomb aspect of the prismatic enamel layer<sup>19</sup>. The appearance of erosion, progressing from the dissolution of the aprismatic enamel layer until the complete exposure of the prismatic areas<sup>17</sup>, that thoroughly acquired the aspect of honeycomb<sup>19</sup>, is characteristic of severe superficial enamel erosion<sup>16, 19</sup>.

In spite of the consensus that saliva exerts some degree of protection on enamel surface against demineralization<sup>20</sup>, the previous immersion of the enamel blocks of the experimental group in saliva did not seem to be able to protect the enamel surface from demineralization caused by exposure to wine.

Altogether, other authors verified that the salivary pellicle formed on enamel surface was able to protect it to a certain degree<sup>19, 21</sup>, against demineralization due to acid exposure. These differences in results can be explained by the different methods used in order to evaluate tooth erosion, or even by the differences among the methods chosen to form pellicle over the enamel blocks. In the experiment where salivary pellicle was formed *in situ* over the enamel blocks<sup>21</sup> there was protection against acid exposure, in opposition to what was observed in this experiment where salivary pellicle formation took place *in vitro*.

However it was also observed a certain degree of protection against demineralization in other experiments where enamel blocks were incubated *in vitro* with saliva in order to form a salivary pellicle on enamel blocks<sup>12, 19</sup>. These differences among results of experiments could rely on the differences in exposure periods (e.g. immersion in saliva or in acids) or even

in differences among the types of acids used to produce enamel demineralization. Different acids could act significantly different when in contact with the structure of the salivary pellicle. It is known that in demineralization processes the type of acid and its concentration is more important than the pH alone in determining the erosive potential of a given substance <sup>6</sup>.

#### **6.2.5. Conclusions.**

It is concluded that, in the conditions of this experiment, immersion in saliva previous to exposure to wine was not able to protect bovine enamel surface against demineralization, and that the wine tested in this experiment was able to produce significant erosion on bovine enamel surface, in this *in vitro* model.

#### **6.2.6. Acknowledgements.**

To Berenice Deadavid, PhD and Giovana Machado, MsC, respectively coordinator and technique at the Center of Microscopy and Microanalysis at PUCRS for the significant collaboration to the accomplishment of this experiment.

### **6.3. REFERENCE MATERIAL**

#### **6.3.1. Bibliographic Reference of the paper.**

HUGO F. N., SOUZA M. A. L. de, PADILHA D. M. P. *In vitro* erosive effect of a Brazilian red wine on bovine enamel.

#### **6.3.2. Resumo.**

O consumo de vinho está associado ao desenvolvimento de erosão dentária. O objetivo deste trabalho foi descrever o efeito erosivo de um vinho tinto brasileiro sobre o esmalte bovino previamente imerso em saliva humana e água. Blocos de esmalte foram cortados com disco diamantado, lavados com água destilada, submetidos ao ultra-som, secos e as faces cortadas, e metade das superfícies cobertas com esmalte de unhas. Metade dos blocos foram mantidos em água e os restantes imersos em saliva humana por 12 H. Depois disso as peças foram lavadas e imersas no vinho durante 1 hora, lavadas novamente, sonicadas com acetona, lavadas e deixadas para secar. Foram então metalizadas com ouro para microscopia eletrônica de varredura. O pH do vinho foi medido antes do início do estudo. Os espécimes foram investigados sob pequenos e grandes aumentos seguindo-se a borda da superfície do esmalte para que se detectassem mudanças na superfície do esmalte. Não houve diferenças nos aspectos da erosão ocorridos tanto no grupo de blocos imerso em saliva como no em água. O efeito erosivo em ambos os grupos foi similar. Em alguns blocos poucos efeitos erosivos foram observados, resultado do alargamento de ranhuras fisiológicas do esmalte. Quando eram mais pronunciadas as ranhuras desapareciam. Em blocos onde havia erosão severa, foi possível reconhecer o aspecto de favos de mel dos prismas de esmalte, que algumas vezes eram rasos, outras profundos. Concluiu-se que esmalte bovino imerso em vinho tinto com pH 4,55 por uma hora sofreu erosão. Nas condições deste experimento, saliva não protegeu a superfície do esmalte.

### **6.3.3. Unitermos.**

Erosão do dente, Esmalte dentário, Microscopia eletrônica de varredura, Saliva, Vinho.

### **6.3.4. Bibliographic References.**

1. Foppa, M.; Fuchs, F. D.; Duncan, B. B. Alcohol and atherosclerosis. *Arq Bras Cardiol*, v. 76, p. 165-176. 2001.
2. Belleville, J. The French paradox: possible involvement of ethanol in the protective effect against cardiovascular diseases. *Nutrition*, v. 18, p. 173-177. 2002.

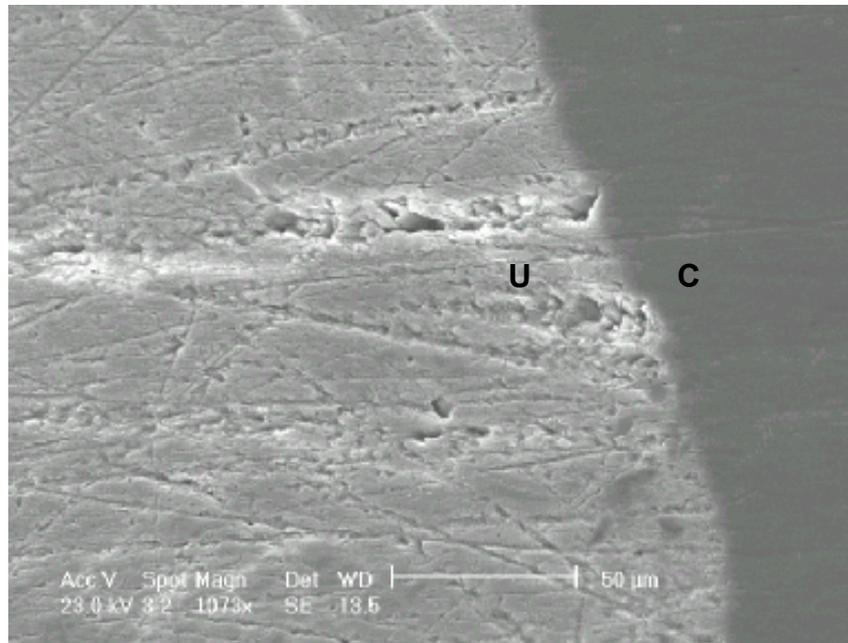
3. Wiktorsson, A. N.; Zimmerman, M.; Angmar-Månsson, B. Erosive tooth wear: prevalence and severity in Swedish wine tasters. *Eur J Oral Sci*, v. 105, p. 544-550. 1997.
4. Gray, A.; Ferguson, M. M.; Wall, J. G. Wine tasting and dental erosion. Case report. *Aust Dent J*, v. 43, p.32-34. 1998.
5. Meurman, J. K.; Vesterinen, M. Wine, alcohol, oral health, with special emphasis on dental erosion. *Quintessence Int*, v. 31, p. 729-733. 2000.
6. Mok, T. B.; McIntyre, J.; Hunt, D. In vitro model of wine assessor's erosion. *Aust Dent J*, v. 46, p. 263-268. 2001.
7. ten Cate, J. M.; Imfeld, T. Dental erosion, summary. *Eur J Oral Sci*, v. 104, p. 241-244. 1996.
8. Moss, S. J. Dental erosion. *Int Dent J*, v. 48, p.529-539. 1998.
9. West, N. X.; Maxwell, A.; Hughes, J. A *et al.* A method to measure clinical erosion: the effect of orange juice consumption on erosion of enamel. *J Dent*, v. 26, p. 329-335. 1998.
10. Lussi, A.; Jäggi, T.; Schärer, S. The influence of different factor on in vitro enamel erosion. *Caries Res*, v. 27, p. 387-393. 1993.
11. Maia, L. C.; Modesto A. Análise comparativa, ao microscópio eletrônico de varredura, de esmalte bovino exposto a diferentes soluções ácidas. Um estudo *in vitro*. *Rev Odontol Univ São Paulo*, v. 10, p. 161-168. 1996.
12. Maupomé, G.; Aguilar-Avila, M.; Medrano-Ugalde, H. A. *et al.* *Caries Res*, v. 33, p. 140-147. 1999.

13. Meurman, J. H.; Sorvari, R.; Pelttari, A *et al.* Hospital mouth-cleaning aids may cause dental erosion. *Spec Care Dent*, v. 16, p. 247-250. 1996.
14. McCracken, M.; O'Neal, S. J. Dental erosion and aspirin headache powders: A clinical report. *J Prosthodontics*, v. 9, p. 95-98. 2000.
15. Larsen, M. J. Demineralization of human enamel. *Scand J Dent Res*, v. 82, p. 491-495. 1974.
16. Davis, W. B.; Winter, P. J. The effect of abrasion on enamel and dentine and exposure to dietary acid. *Brit Dent J*, v. 148, p. 253-256. 1980.
17. Millward, A.; Shaw, L.; Smith, A. J. In vitro techniques for erosive lesion formation and examination in dental enamel. *J Oral Rehab*, v. 22, p. 37-42. 1995.
18. Padilha, D. M. P.; Hammes, M. Mesa milimetrada para corte de tecidos duros: nota prévia. *Rev Fac Odont Porto Alegre*, v. 39, p. 24-25. 1998.
19. Meurman, J. H.; Frank, R. M. Scanning electron microscopic study of the effect of salivary pellicle on enamel erosion. *Caries Res*, v. 25, p. 1-6. 1991.
20. Meurman, J. H.; ten Cate, J. M. Pathogenesis and modifying factors of dental erosion. *Eur J Oral Sci*, v. 104, p. 199-206. 1996.
21. Hannig, M.; Baltz, M. Influence of *in vivo* formed salivary pellicle on enamel erosion. *Caries Res*, v. 33, p. 372-379. 1999.

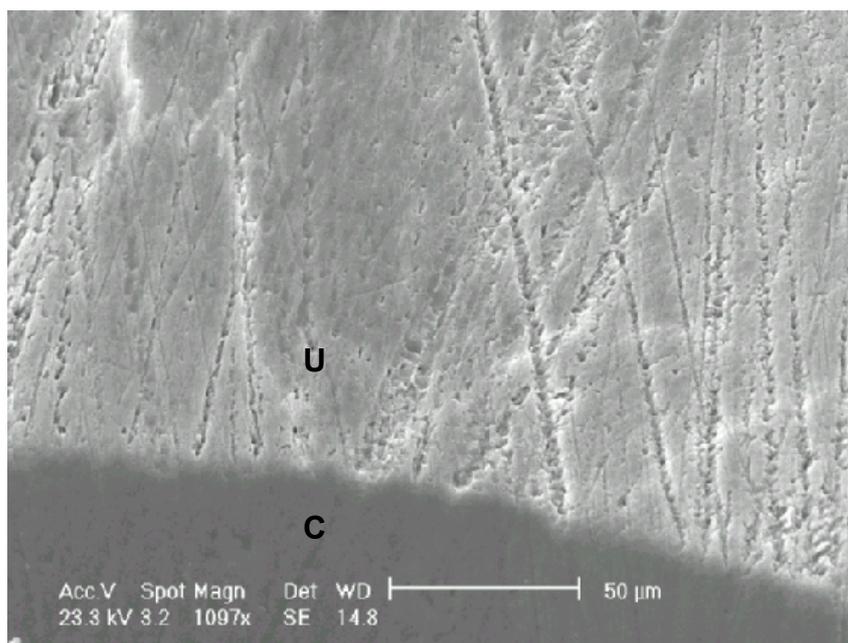
#### **6.3.5. Address.**

Fernando Neves Hugo, fnhugo@zipmail.com.br, fone (51) 3246-9646, fax (51) 3232-3364;  
Maria Antonieta Lopes de Souza, carollo@zaz.com.br, fone (51) 9808-8637; Dalva Maria  
Pereira Padilha, dpadilha@via-rs.net, (051) 9964-8321.

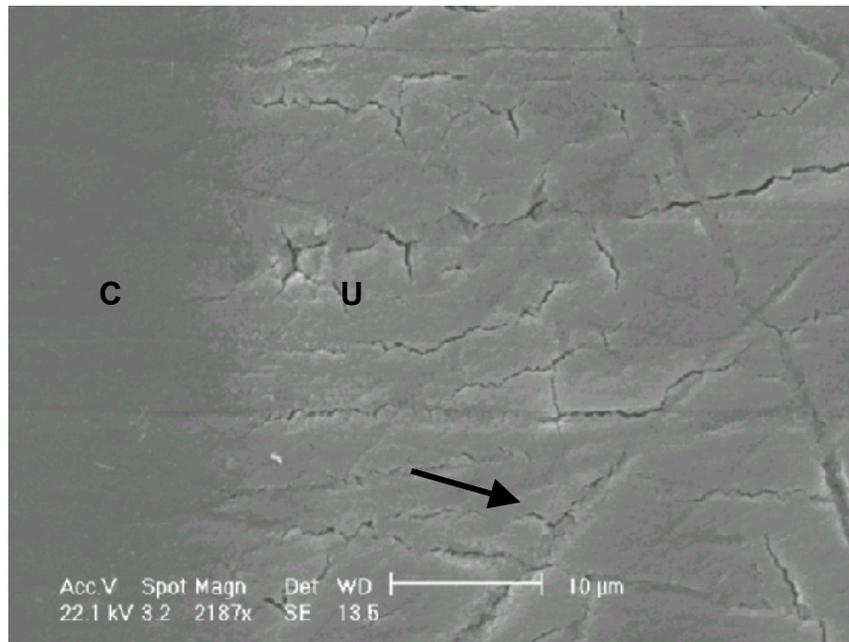
**Figure 1.** Scanning electron micrograph showing discrete erosion in the bovine enamel surface in a block previously immersed in saliva (1073X), **v** are the areas covered by the nail varnish and **u** are the areas not covered before immersion in wine (bars represent 50µm).



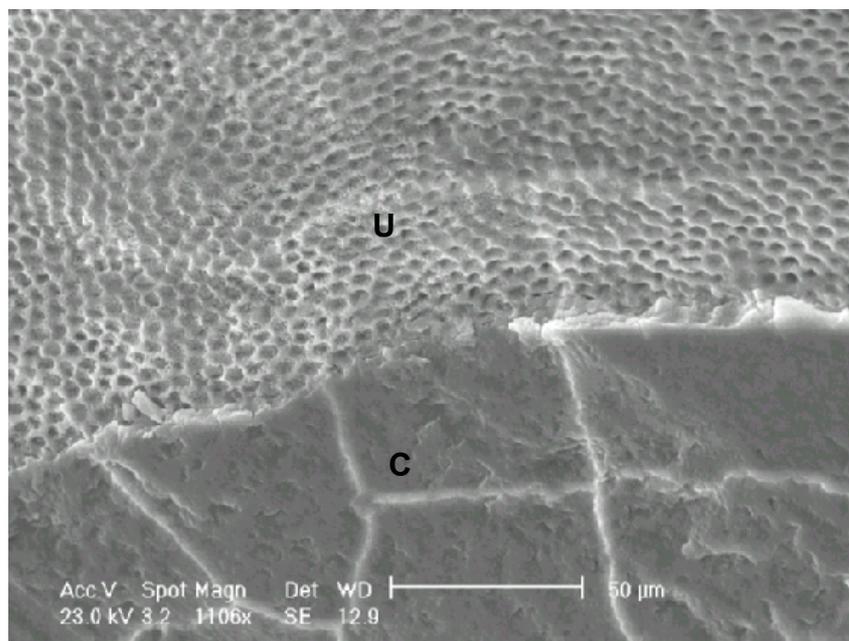
**Figure 2.** Discrete erosion in bovine enamel surface in a block previously immersed in water (1097X), **v** are the areas covered by the nail varnish and **u** are the areas not covered before immersion in wine (bars represent 50µm).



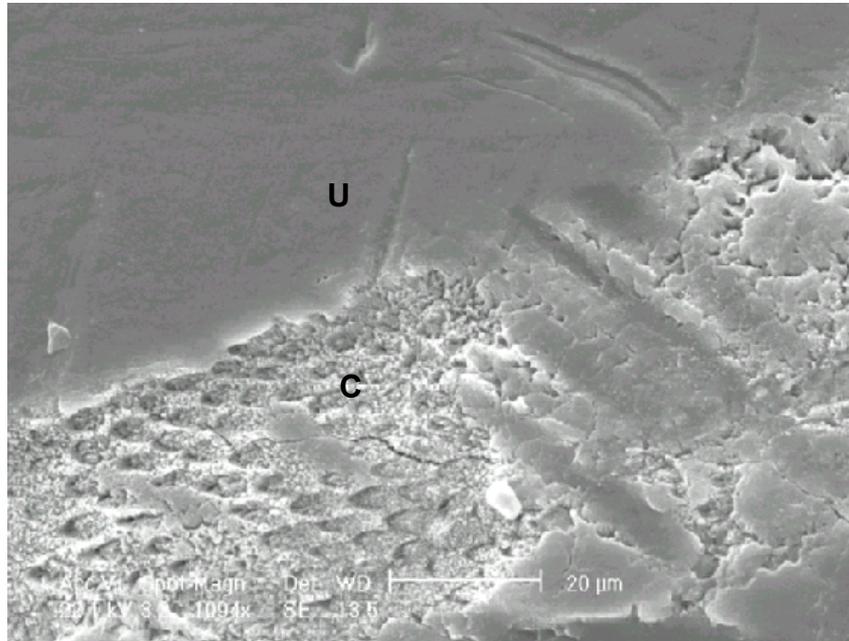
**Figure 3.** Scanning electron micrograph (2187X) where erosion is discrete in bovine enamel surface in a block previously immersed in saliva. The arrow shows a physiological enamel scratch, **v** is the area covered by the nail varnish and **u** is the area not covered before immersion in wine (bar represents 10 $\mu$ m).



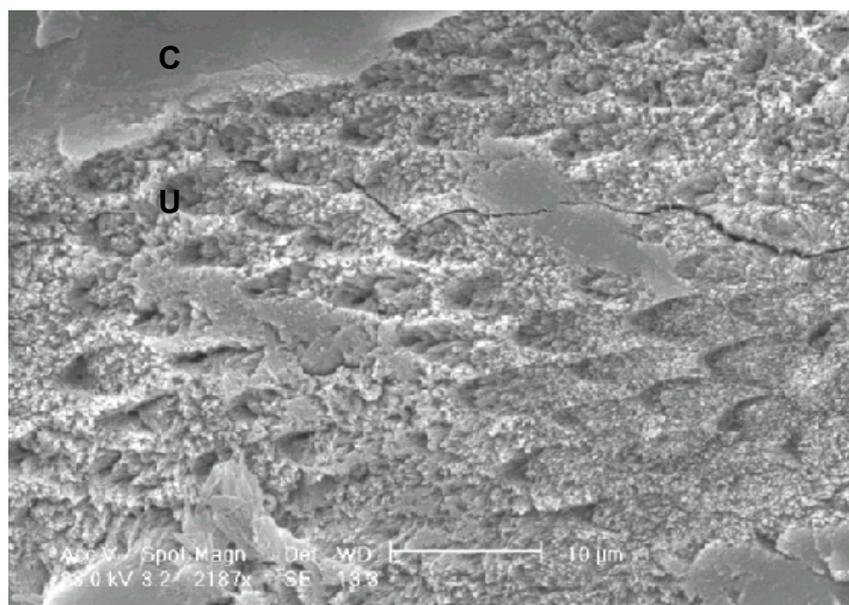
**Figure 4.** Scanning electron micrograph (1106X) showing severe erosion of bovine enamel surface on a block previously immersed in saliva. The narrow aspect of the honeycombs in the prismatic enamel layer are evident, **v** is the area covered by the nail varnish and **u** is the area not covered before immersion in wine (bar represents 50 $\mu$ m).



**Figure 5.** Scanning electron micrograph (1094X) showing severe erosion of bovine enamel surface on a block previously immersed in water. The wide aspect of the honeycombs in the prismatic enamel layer are evident, **v** is the area covered by the nail varnish and **u** is the area not covered before immersion in wine (bar represents 20 $\mu$ m).



**Figure 6.** Scanning electron micrograph (2187X) showing severe erosion of bovine enamel surface on a block previously immersed in saliva. The wide aspect of the honeycombs in the prismatic enamel layer are evident, **v** is the area covered by the nail varnish and **u** is the area not covered before immersion in wine (bar represents 10 $\mu$ m).



## **7. ARTIGO 2**

HUGO F. N., AMENÁBAR J. M., PADILHA D. M. P. Confiabilidade de um método para quantificação de erosões dentárias em camundongos.

A formatação do artigo está de acordo com as instruções para autores da Revista Pesquisa Odontológica Brasileira, publicação da Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica e da Universidade de São Paulo, que está indexada nas bases de dados: LILACS, Bibliografia Brasileira de Odontologia, Biological Abstract, Index Medicus, Index to Dental Literature, MEDLARS, Medline, PubMed, The Serials Directory e Ulrich's.

## **7.1. PRELIMINARES**

### **7.1.1. Cabeçalho.**

Confiabilidade de um método para quantificação de erosões dentárias em camundongos.

Reliability of a method to quantify dental erosion in mice.

Fernando Neves Hugo<sup>1</sup>, José Miguel Amenábar<sup>1</sup>, Dalva Maria Pereira Padilha<sup>2</sup>.

### **7.1.2. Referência Bibliográfica.**

HUGO F. N., AMENÁBAR J. M., PADILHA D. M. P. Confiabilidade de um método para quantificação de erosões dentárias em camundongos.

### **7.1.3. Resumo.**

Erosão descreve o processo de destruição gradual da face de algo, geralmente por processos eletrolíticos ou químicos, sem envolvimento bacteriano. Foram objetivos deste experimento desenvolver e avaliar a confiabilidade de um método para quantificação de erosões dentárias em roedores. Para tal fim foram utilizados 60 camundongos distribuídos nos grupos: controle, composto por animais que consumiram água destilada; e teste, por animais que consumiram vinho tinto ao longo do período experimental. Os animais foram mortos e suas hemi-mandíbulas direitas removidas, coradas e fotografadas sob aumento para análise das variáveis (áreas): Total; Intacta; de Erosão em Esmalte; de Erosão em Dentina; e Total de Erosão. A abordagem estatística utilizada neste estudo é uma aplicação da proposta por Bland e Altman para verificação da confiabilidade de dados contínuos. Nas variáveis avaliadas nos grupo controle e teste, os valores da confiabilidade e dos limites de concordância intra e interexaminadores foram, de modo geral, próximos a zero, não causando impacto sobre o

---

<sup>1</sup> Mestrando do Programa de Pós-Graduação em Gerontologia Biomédica da PUCRS.

<sup>2</sup> Professora Doutora do Programa de Pós-Graduação em Gerontologia Biomédica da PUCRS.

tamanho dos resultados, exceto para a variável Erosão Total no primeiro molar, e algumas variáveis no segundo e na soma de primeiro e segundo molares, indicando a boa confiabilidade do método proposto. Recomenda-se, então, o uso dos primeiros molares e das variáveis: Área Intacta, Erosão em Esmalte, Erosão em Dentina e Área Total pela boa confiabilidade/precisão das medições realizadas.

#### **7.1.4. Unitermos.**

Camundongos, Erosão do dente, Reprodutibilidade de resultados, Roedores.

## **7.2. TEXTO**

### **7.2.1. Introdução.**

#### **7.2.1.1. Conceituação e etiopatogênese das erosões dentárias.**

Erosão, deriva do verbo latim *erodere, erosi, erosum* (corroer), e descreve o processo de destruição gradual da face de algo, geralmente por processos eletrolíticos ou químicos<sup>1</sup>. O termo clínico erosão dentária é utilizado para descrever os resultados físicos de uma perda crônica, patológica e localizada do tecido mineralizado das faces dentárias por meio de contato com ácido ou quelação, sem envolvimento bacteriano. O agente causal é, geralmente, um ácido<sup>2,3</sup>. Elas ocorrem devido a uma desmineralização química causada por líquidos subsaturados em relação a hidróxi e a fluorapatita e cuja cinética de dissolução está relacionada a reações controladas pelo grau de difusibilidade dos ácidos em solução. Os ácidos, portanto, estão diretamente relacionados com o processo erosivo na medida que são freqüentemente subsaturados em relação a hidróxi e a fluorapatita<sup>4</sup>.

As erosões dentárias podem ser denominadas extrínsecas, intrínsecas ou idiopáticas, levando-se em consideração que a partir da realização de uma anamnese, podemos verificar os ácidos que causam erosão dentária, e que podem ser de origem: exógena, como os ácidos

presentes na dieta e no ambiente de trabalho; endógena, como os ácidos do suco gástrico; ou desconhecida<sup>1</sup>.

#### 7.2.1.2. Roedores como modelo para investigação de erosões dentárias.

Alguns pesquisadores se dedicaram a investigar erosão dentária em roedores, que constituem um interessante modelo *in vivo* para avaliação destas lesões. Entre os métodos empregados estão: microscopia eletrônica de varredura<sup>5</sup> e medição das áreas de erosão dentária<sup>6, 7</sup>. Eles foram aplicados para que se investigassem tanto as alterações micromorfológicas resultantes de um desafio por dieta ácida<sup>5</sup>, como para avaliação quantitativa do papel de diferentes agentes causais<sup>7, 8</sup> e da adição de flúor<sup>8</sup> no desenvolvimento das erosões dentárias. Os resultados destes estudos indicam, de modo geral, que o potencial erosivo de bebidas ácidas nestes sistemas experimentais *in vivo* é significativo.

Não há, porém, nestes experimentos, verificação da confiabilidade das metodologias empregadas para avaliação de erosões dentárias em roedores<sup>9</sup>. Para tal seriam necessárias medições repetidas das variáveis testadas nas amostras, mas estas são raramente realizadas e, portanto, um importante aspecto da comparabilidade é freqüentemente subestimado<sup>10</sup>. Como consequência o desenvolvimento de novos métodos e a reprodução de outros já descritos na literatura, como no caso das erosões dentárias, ficam comprometidas.

#### 7.2.1.3. Confiabilidade de dados contínuos.

A quantidade de variação que existe em medições repetidas de uma mesma amostra ou indivíduo, propriedade conhecida como confiabilidade, é afetada pelo erro aleatório; quanto maior o erro menos precisa é a medida. Há três principais fontes de erros nas medidas: variabilidade do observador, variabilidade do sujeito, e variabilidade do instrumento. A variabilidade do observador se refere à variabilidade na medida causada pelo observador<sup>11</sup>, por exemplo, a habilidade no manuseio de um instrumento, como um software de análise de imagens. É esta a fonte de variabilidade das amostras avaliadas neste estudo.

Esta confiabilidade pode ser abordada seja na atividade na clínica, quando nos deparamos com a precisão de um instrumento para diagnóstico de doença cárie; seja na

performance em laboratório, quando desejamos aferir um eletrodo íon específico, por exemplo. Então, para que se desenvolvam novos métodos, ou para que os instrumentos que utilizamos sejam confiáveis, é fundamental que se averigüe o desempenho das técnicas depois de repetidas medições de uma mesma amostra.

A verificação da confiabilidade se dá por meio da verificação da consistência das seguintes medidas: reprodutibilidade intraobservador, onde um único observador realiza medições repetidas em um conjunto de amostras; e reprodutibilidade interobservador, onde diferentes observadores realizam medições em um conjunto de amostras <sup>11</sup>.

São, portanto, objetivos deste experimento desenvolver um método para quantificação de erosões dentárias em roedores e avaliar sua confiabilidade.

## 7.2.2. Material e Métodos.

### 7.2.2.1. Animais e dieta.

Neste estudo experimental foram utilizados 60 camundongos *mus domesticus domesticus*, linhagem cfl, machos, com doze meses de idade. Os animais foram mantidos, durante o experimento, em gaiolas individuais e aleatoriamente distribuídos nos seguintes grupos: **controle**, composto por 30 animais que consumiram água destilada e ração *ad libitum* ao longo do período experimental; e **teste**, composto por 30 animais que consumiram vinho tinto (Vinho Tinto Seco Garibaldi, Cooperativa Vinícola Garibaldi) e ração *ad libitum* ao longo do período experimental.

Estes animais foram obtidos, mantidos e manipulados nas instalações do biotério da Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde do Estado Rio Grande do Sul (FEPPS). O protocolo deste experimento foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Saúde do Hospital São Lucas da PUCRS. A troca de líquido e ração das gaiolas dos animais foi realizada pelos pesquisadores responsáveis, pelo menos duas vezes por semana, durante o período experimental. O volume de água destilada e vinho tinto consumido por cada animal foi verificado em cada uma destas trocas, e o ganho de peso dos animais verificado semanalmente. Condições padronizadas de iluminação (12 horas de luz/ 12 horas de

escuridão) e temperatura (aproximadamente 20°C) foram mantidas ao longo do período experimental.

#### 7.2.2.2. Processamento das amostras.

Ao final de 15, 30, ou 45 dias os animais foram anestesiados (ketamina 100g/l (Francotar, Virbac) + solução aquosa 2% de cloridrato de 2-(2,6-xilidino)-5,6-dihidro-4-H-1,3-tiazina (Rompun, Bayer), na proporção 1:1, em dose de 1,0ml/kg), e mortos por meio de decapitação. As mandíbulas foram cuidadosamente removidas e separadas nas metades com auxílio de um bisturi tipo Bard-Parker e lâminas nº 15. As metades direitas foram fixadas em formalina tamponada 10 % por pelo menos 48 horas e dissecadas sob aumento de um lupa cirúrgica (M900, DFVasconcellos) até que se removesse todo o tecido mole. As hemimandíbulas resultantes deste processo foram armazenadas em formalina tamponada 10% até que se completasse este processamento inicial de todas as amostras.

As amostras obtidas do processamento inicial foram secas com papel absorvente e tiveram suas faces linguais pinceladas com azul de toluidina para que se evidenciassem os limites de esmalte, dentina, cemento e osso. O excesso de corante resultante do pincelamento foi removido com auxílio de papel absorvente. As peças foram deixadas para secar por aproximadamente dois minutos e levadas a um estereomicroscópio (B201, Olympus). Uma inspeção cuidadosa foi efetuada em cada amostra para que se removesses quaisquer detritos presentes.

Cada hemi-mandíbula foi fotografada sob aumento, iluminação e posição padronizadas num estereomicroscópio (B201, Olympus), com filme fotográfico convencional (Kodak Ultra 135 ASA 100, Kodak). A padronização do aumento e da iluminação das amostras foi garantida pelas marcações próprias do estereomicroscópio. Já a padronização do posicionamento das amostras foi garantida por um aparelho especialmente desenhado pelos pesquisadores. Ele foi composto por: uma mesa de polimetilmetacrilato de dimensões 3X3 centímetros, angulada aproximadamente 45° em relação à base do estereomicroscópio, cuja finalidade foi permitir que as faces linguais dos molares dos animais estivessem sempre perpendiculares e as oclusais sempre paralelas ao eixo de foco do estereomicroscópio; e duas hastes metálicas com três centímetros de comprimento, distantes aproximadamente cinco milímetros entre si, cuja função foi fixar as hemi-mandíbulas na mesa angulada.

### 7.2.2.3. Análise das amostras.

As fotografias obtidas a partir do processamento descrito foram digitalizadas com o auxílio de um scanner de mesa (Epson Expression 636) e processadas com o software de análise de imagens UTHSCSA Image Tool versão 2.02 (disponível para download no endereço: <http://ddsdx.uthscsa.edu/dig/download.html>). Foram analisadas as variáveis: **Área Total**, compreendendo a área formada por uma linha que percorre a junção cimento/esmalte e as bordas mesial, distal e oclusal da face lingual dos primeiros, dos segundos molares mandibulares, e da soma das áreas destes; **Área Intacta**, situada acima da junção cimento e esmalte, e compreendendo a região de esmalte íntegro da face lingual dos primeiros, dos segundos molares mandibulares, e da soma das áreas destes; **Área de Erosão em Esmalte**, encontrada entre a área intacta e a borda inferior da área de dentina exposta na face lingual dos primeiros, dos segundos molares mandibulares, e a soma das áreas destes; **Área de Erosão em Dentina**, claramente observável pelo uso do corante <sup>6</sup>, encontrada acima da borda limítrofe superior da área de erosão em esmalte na face lingual dos primeiros, dos segundos molares mandibulares, e na soma das áreas destes; e **Área Total de Erosão**, correspondendo à soma das áreas de erosão em esmalte e dentina na face lingual dos primeiros, dos segundos molares mandibulares, e a soma das áreas destes. Os resultados foram expressos sempre em mm<sup>2</sup>.

### 7.2.2.4. Análise estatística.

A abordagem estatística utilizada neste estudo é uma aplicação da proposta por Bland e Altman <sup>10, 12</sup> para verificação da confiabilidade de dados contínuos. Neste estudo foram analisados os dados obtidos a partir de pares de medições repetidas das mesmas imagens digitalizadas, com a finalidade de avaliar a confiabilidade da metodologia proposta. Para tal, dois avaliadores treinados previamente, que não conheciam o grupo ao qual as amostras pertenciam, utilizando os critérios propostos no item Análise das amostras, realizaram duas medições de todas as imagens cada, com intervalos de duas semanas entre elas.

A confiabilidade da metodologia proposta foi expressa por meio: da plotagem das diferenças para cada par observação contra os valores médios dos pares de observações intra e interexaminador realizadas; das médias e dos desvios-padrão das diferenças intra e

interexaminador das medições (confiabilidade); e dos limites de concordância entre as observações intra e entre os avaliadores<sup>10, 12</sup>. As análises foram realizadas com o software SPSS versão 9.0.

### 7.2.3. Resultados.

Nas variáveis avaliadas no grupo controle, os valores da confiabilidade e dos limites de concordância intra e interexaminadores foram, de modo geral, próximos a zero (Tabelas 1, 2 e 3). Exceto pelos valores interexaminador dos limites de concordância da Área Intacta (-0,10 a 0,09) e da Área Total (-0,10 a 0,09) no primeiro molar (Tabela 1), e pelos valores interexaminadores da confiabilidade (-0,13 ( $\pm 0,38$ )) e dos limites de concordância (-0,89 a 0,63) da Área Total para a soma da Área dos primeiros e segundos molares (Tabela 3). As plotagens da diferença em relação à média dos pares de observações versus a média das diferenças são ilustrativas, sejam elas intra ou interexaminadores tanto das diferenças próximas a zero (Gráfico 1) como das mais significativas (Gráfico 2)<sup>12</sup>, para as amostras do grupo controle.

Nos valores das amostras do grupo teste, as diferenças médias intraexaminador entre os pares de observações (confiabilidade) foram pequenas (Gráfico 3), tanto nas medições realizadas nos primeiros como nas realizadas nos segundos molares, para a maioria das variáveis testadas (Tabelas 1 e 2). Porém, os valores dos limites de concordância das Áreas de Erosão Total (-0,11 a 0,09), Total (-0,11 a 0,09) e Erosão em Esmalte (-0,07 a 0,08) dos primeiros molares e das Áreas de Erosão em Dentina (-0,07 a 0,05) e Total (-0,05 a 0,07) dos segundos molares obtidos pelas medições do examinador 1 foram, considerando-se as extensões avaliadas, importantes (Tabelas 1 e 2).

As diferenças entre os pares de observações entre os examinadores para as amostras de primeiros e segundos molares do grupo teste foram, nas variáveis avaliadas, próximos de zero. Há, entretanto, que se observar que os desvios-padrão para estes pares de medições foram mais altos, refletindo sobre a extensão dos valores dos limites de concordância interexaminadores (Gráfico 4). Nas amostras dos primeiros e segundos molares do grupo teste estes valores foram parecidos para todas as variáveis analisadas (Tabelas 1 e 2).

Os valores da confiabilidade e dos limites de concordância intra e interexaminadores para as amostras das somas das áreas de primeiros e segundos molares do grupo teste são representados na tabela 3. As médias das diferenças intraexaminador de todas as variáveis examinadas foram, na sua maioria, próximas do zero. Todavia os desvios-padrão das diferenças para as medições do examinador 1 acharam-se elevados devido à soma dos valores das diferenças das medições dos primeiros e segundos molares. Os resultados da confiabilidade e dos limites de concordância interexaminador para as amostras das somas das áreas de primeiros e segundos molares do grupo teste não foram diferentes do panorama descrito acima para os valores intraexaminador, no caso examinador 1. Novamente, apesar de as diferenças médias para todas as variáveis avaliadas ser pequena, os desvios-padrão foram altos (Gráfico 5) e determinaram limites de confiança com amplitude importante do ponto de vista da confiabilidade dos resultados (Tabela 3).

Os valores das médias de cada uma das duas medições, para todas as variáveis avaliadas nos grupos teste e controle realizados, pelos dois avaliadores, são mostrados nas tabelas 4 e 5.

#### **7.2.4. Discussão.**

Roedores têm sido utilizados como modelo para estudo de erosão dentária desde a primeira metade do século XX. Porém a comparação direta entre os resultados destes experimentos é extremamente problemática. Isto se dá porque nenhum deles proveu análise dos dados que estabelecesse quando suas observações tinham validade/confiabilidade estatística <sup>9</sup>, dificultando também a estimação da consistência dos resultados.

Dois dos estudos mais recentes <sup>7, 8</sup> que utilizaram roedores como modelos experimentais para avaliação quantitativa de erosões dentárias utilizaram, como unidade de análise, as áreas de erosão dentária. Os achados destes investigadores mostraram que as áreas de erosão foram significativamente maiores nos molares de animais que consumiram líquidos ácidos do que as de áreas de erosão nos molares de animais de grupos controle <sup>7, 8</sup>, e também que a adição de flúor resultou em efeito protetor sobre os molares dos animais <sup>8</sup>. Entretanto, evidências da confiabilidade das medições realizadas não foram fornecidas, o que prejudica a consistência dos resultados obtidos, principalmente quando se pensa na amplitude dos limites

de concordância das medições das áreas de erosão, por exemplo, e no impacto dos mesmos sobre a significância das diferenças observadas os grupos expostos ou não a ácido e o tamanho do efeito protetor proporcionado pela adição de flúor ao líquido de beber dos animais.

Quando se pensa no desenvolvimento de um método, como em modelos para quantificação de erosão dentária em roedores <sup>7, 8</sup>, é fundamental que se averigüe o desempenho das técnicas depois de repetidas medições de uma mesma amostra e, quando possível, que se faça uma comparação entre uma técnica antiga e a que é proposta <sup>12, 14</sup>. Portanto a verificação da confiabilidade das medições realizada neste estudo é fundamental quando se pensa no desenvolvimento do método que está sendo proposto.

Para a verificação da precisão/confiabilidade de dados contínuos, como no caso deste experimento, algumas abordagens estatísticas têm sido empregadas. Entre elas os coeficientes de correlação, muito utilizado por pesquisadores para comparação de diferentes métodos, testes clínicos e medições repetidos. Porém  $r$  mede a força da relação entre duas variáveis, e não a concordância entre elas. Além disso, as correlações dependem da variação do valor real das amostras. Se ela é grande, a correlação será maior. Como de maneira geral os pesquisadores tentam comparar o desempenho de dois métodos ou medições considerando toda a variação possível para um universo de dados, podemos quase com certeza esperar uma correlação alta. Isto significa dizer que se coeficientes de correlação forem utilizados podemos ter correlação alta e significativa mesmo que o tamanho das diferenças entre as medições tenha impacto sobre os achados do estudo, mascarando assim deficiências do método, ou mesmo mostrando correlações significativas onde elas não existem <sup>13</sup>.

Testes de significância da mesma forma são utilizados, mas mostram apenas quanto dois métodos estão relacionados. No caso específico do teste t de Student a relação é entre as médias de dois pares ou grupos diferentes de observações, e seu uso é, porém irrelevante como os coeficientes de correlação para mostrar o quanto duas medições concordam entre si <sup>13</sup>.

Como já mencionado no item Materiais e Metodologia, a abordagem para verificação da confiabilidade utilizada neste estudo foi a proposta por Bland e Altman <sup>10, 12</sup> e consta da verificação da média e desvio padrão das diferenças entre as medições repetidas

(confiabilidade), da plotagem da média dos pares de observação versus a diferença em relação às médias, e também da estimação dos limites de concordância. Esta foi a abordagem utilizada, pois possibilita que se estime numericamente o quanto, em média, foi o tamanho das diferenças entre os pares de medições de uma mesma amostra (confiabilidade), e qual a variação esperada para uma população de dados (limites de concordância).

A interpretação dos resultados depende, por conseguinte, da diferença entre as observações. Se esta não for grande o suficiente para causar problemas de interpretação, então as medições repetidas não estão variando de modo significativo entre si <sup>12</sup>. Isto significa dizer que se os resultados das medições repetidas foram consistentes, ou seja, se o tamanho da diferença entre as medições foi pequeno, como para as variáveis avaliadas neste experimento, os resultados do método proposto, como este para mensuração de avaliação de erosão dentária, não serão prejudicados pelo erro aleatório <sup>11</sup>.

Abordando os achados deste experimento, mais especificamente, é importante destacar que as médias das diferenças intra e interexaminador das variáveis avaliadas no grupo controle foram, na maioria das vezes, próximas de zero. Estes resultados indicam a boa precisão, melhorando assim as inferências causais do estudo para o universo <sup>11</sup>, e a validade de resultados que podem ser obtidos a partir do método proposto. Há, entretanto, que se ressaltar que a confiabilidade e os limites de concordância da Área Total da soma de primeiro e segundo molares interexaminador (Tabela 3) foram altos quando comparados com a média dos valores para estas medições (Tabelas 4 e 5), o que diminui a precisão/confiabilidade, dificultando o uso desta soma das medições de primeiro + segundo molares para a variável Área Total nas amostras do grupo controle.

A confiabilidade intraexaminador e interexaminador das amostras do grupo teste foi boa tanto para os primeiros como para os segundos molares (Tabelas 1 e 2), com a média das diferenças entre os pares de medições sempre próximo de zero. Alguns dos valores dos limites de concordância foram mais amplos, porém, devido a maiores desvios-padrão das diferenças. Exemplos são os valores das medições intraexaminador (Avaliador 1) para as variáveis Erosão Total, Total e Erosão em Esmalte dos primeiros molares (Tabela 1) e das Áreas de Erosão em Dentina e Total dos segundos molares (Tabela 2); e os valores interexaminadores para as medições dos primeiros e dos segundos molares (Tabelas 1 e 2), que foram similares para todas as variáveis analisadas. É importante destacar que a interpretação dos resultados

obtidos a partir desta abordagem depende do tamanho do valor das variáveis que estão sendo analisadas <sup>12</sup>. Por conseguinte, já que o tamanho dos resultados foi similar, e que Área Total dos segundos molares é aproximadamente a metade da Área Total dos primeiros, pode se considerar que a confiabilidade interexaminador das medições realizadas no segundo molar ficam prejudicadas (Tabelas 1 e 2), enquanto as medições no primeiro molar estão dentro de limites que não trazem prejuízo aos resultados, o que indica que os valores obtidos para os segundos molares têm repercussão maior sobre os resultados que os obtidos para os primeiros molares.

Os resultados da confiabilidade e dos limites de concordância intra e interexaminador para as amostras das somas das áreas de primeiros e segundos molares do grupo teste mostram médias das diferenças próximas de zero e desvios-padrão altos. Isto determinou limites de confiança com maior amplitude (Tabela 3). Quando se observam as médias dos valores para as variáveis avaliadas (Tabelas 4 e 5), pode-se notar que o tamanho do intervalo dos limites de concordância tem impacto sobre a precisão das medidas executadas. A explicação possível para este fenômeno é que esta maior imprecisão entre os valores dos pares de medições é resultado da soma dos erros aleatórios para as medições de primeiro e segundo molares.

Considerando-se o impacto dos achados sobre os resultados de um experimento que utilize este método para a avaliação dos diferentes aspectos associados à erosão dentária em roedores desencoraja-se o uso das medições das variáveis testadas em segundos molares e também o uso das somas das áreas de primeiros e segundos molares. Também se desencoraja o uso da variável Área de Erosão Total quando da avaliação de primeiros molares, pelos mesmos motivos listados quando da discussão dos resultados de confiabilidade das medições resultantes da soma das áreas de primeiros e segundos molares.

#### **7.2.5. Conclusões.**

Recomenda-se o uso dos primeiros molares e das variáveis: Área Intacta, Erosão em Esmalte, Erosão em Dentina e Área Total quando do uso de roedores como modelo para avaliação de erosões dentárias, devido à boa confiabilidade/precisão das medições realizadas.

### **7.2.6. Agradecimentos.**

Aos funcionários da FEPPS, pela atenção dispensada a nós para que realizássemos o experimento. À Raquel Mattos de Oliveira e ao Professor Doutor Emílio Antônio Jeckel-Neto, respectivamente técnica e coordenador do Laboratório de Biologia do Envelhecimento do IPB-PUCRS, pela pronta disponibilização do laboratório e equipamentos sem os quais não teríamos completado esta tarefa.

## **7.3. MATERIAL DE REFERÊNCIA**

### **7.3.1. Referência Bibliográfica do Artigo.**

HUGO F. N., AMENÁBAR J. M., PADILHA D. M. P. Confiabilidade de um método para quantificação de erosões dentárias em camundongos.

### **7.3.2. Abstract.**

Erosion describes the process of gradual destruction at the surface of something, usually through electrolytic or chemical processes, without bacterial involvement. The aims of this study were to develop and evaluate reliability of a method to investigate tooth erosion in mice. In order to achieve these 60 mice were distributed in the following groups: control, composed by animals that consumed distilled water; and test, formed by animals that consumed red wine as part of their diet during the experimental period. The animals were anesthetized, killed and had their right hemi mandibles removed, stained and photographed under magnification to permit further analysis of the following variables: Total area; Intact area; Enamel erosion area; Dentin erosion area; and Total area of erosion. The statistical approach used in order to perform reliability analysis was the proposed by Bland and Altman for continuous data. The inter and intraexaminer values of reliability and limits of agreement on the variables analyzed for the groups test and control were, in general, next to zero and did not reflect on the size of the results, except for the variable Total Erosion within the first

molar and for some other variables for the second and for the sum of the first and the second molars, evidencing the good reliability of this method. In order to obtain measurements with good precision/reliability The use of the variables Intact area, Enamel erosion area, Dentin erosion area, and Total area within the first molar is recommended.

### **7.3.3. Uniterms.**

Mice, Reproducibility of results, Rodentia, Tooth erosion.

### **7.3.4. Referências Bibliográficas.**

1. Imfeld T. Dental erosion. Definition, classification and links. *European Journal of Oral Sciences* 1996; 104: 151-155.
2. Eccles JD, Jenkins WG. Dental erosion and diet. *Journal of Dentistry* 1973; 2: 153-159.
3. ten Cate JM, Imfeld T. Dental erosion, summary. *European Journal of Oral Sciences* 1996; 104: 241-244
4. Larsen MJ. Demineralization of human enamel. *Scandinavian Journal of Dental Research* 1974; 82: 491-495.
5. Sorvari R, Pelttari A, Meurman JH. Surface ultra structure of rat molar teeth after experimentally induced erosion and attrition. *Caries Research* 1996; 30: 163-168.
6. Sorvari R, Kiviranta I. A semi quantitative method of recording experimental tooth erosion and estimating occlusal wear in the rat. *Archives of Oral Biology* 1988; 33: 217-220.
7. Mistry M, Grenby TH. Erosion by soft drinks of rat molar teeth assessed by digital image analysis. *Caries Research* 1993; 27: 21-25.

8. Sorvari R. Effects of various sport drink on modifications on dental erosion in rats with controlled eating and drinking pattern. *Proceedings of Finnish Dental Society* 1989; 85: 13-20.
9. Zero DT. Etiology of dental erosion - extrinsic factors. *European Journal of Oral Sciences* 1996; 104: 162-177.
10. Altman, DG. Practical statistics for medical research. 1<sup>st</sup> ed. London, Chapman and Hall 1991: 611 p.
11. Hulley SB. Designing clinical research: an epidemiological approach. 2<sup>nd</sup> ed. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins 2001: 336p.
12. Bland JM, Altman DG. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet*. 1986 Feb 8; 1: 307-10.
13. Bland JM, Altman DG. Measurement error and correlation coefficients. *British Medical Journal* 1996; 313: 41-42.
14. Bland JM, Altman DG. Comparing two methods of clinical measurement: a personal history. *International Journal of Epidemiology* 1995; 24 (Suppl 1): S7-14.

#### **7.3.5. Endereço.**

Fernando Neves Hugo, fnhugo@zipmail.com.br, fone (51) 3246-9646, fax (51) 3232-3364; José Miguel Amenábar, fone (51) 3223-5947, jamenaba@terra.com.br; Dalva Maria Pereira Padilha, dpadilha@via-rs.net, (051) 32226426.

**Tabela 1.** Confiabilidade (média das diferenças entre as duas observações  $\pm$  desvio padrão) e limites de concordância das medições de área (em mm<sup>2</sup>) do primeiro Molar de amostras dos grupos controle e teste. Porto Alegre, 2002.

			Intacta	Erosão em Esmalte	Erosão em Dentina	Erosão Total	Total
Avaliador 1 (Medição 1 – Medição 2)	Grupo	Confiabilidade	-0,00 ( $\pm 0,00$ )	0 (0)	0 (0)	0(0)	-0,00 ( $\pm 0,00$ )
	Controle	Limites de concordância	-0,01 a 0	0	0	0	-0,01 a 0
		Grupo Teste	Confiabilidade	0,00 ( $\pm 0,03$ )	-0,00 ( $\pm 0,04$ )	-0,00 ( $\pm 0,03$ )	-0,0 ( $\pm 0,05$ )
			Limites de concordância	-0,05 a 0,06	-0,08 a 0,07	-0,00 ( $\pm 0,03$ )	-0,11 a 0,09
Avaliador 2 (Medição 1 – Medição 2)	Grupo	Confiabilidade	-0,00 ( $\pm 0,00$ )	0,00 ( $\pm 0,00$ )	0 (0)	0,00 ( $\pm 0,00$ )	-0,00 ( $\pm 0,01$ )
	Controle	Limites de concordância	-0,01 a 0,01	-0,00 a 0,00	0	-0,00 a 0,00	-0,02 a 0,19
		Grupo Teste	Confiabilidade	0 ( $\pm 0,01$ )	0,00 ( $\pm 0,00$ )	-0,00 ( $\pm 0,01$ )	0,00 ( $\pm 0,01$ )
			Limites de concordância	-0,01 a 0,01	-0,00 a 0,00	-0,02 a 0,01	-0,01 a 0,02
Inter Avaliador (Medição 1 Avaliador 1 – Medição 1 Avaliador 2)	Grupo	Confiabilidade	0,00 ( $\pm 0,05$ )	-0,00 ( $\pm 0,00$ )	0 (0)	-0,00 ( $\pm 0,00$ )	-0,00 ( $\pm 0,05$ )
	Controle	Limites de concordância	-0,10 a 0,09	-0,01 a 0,01	0	-0,01 a 0,01	-0,10 a 0,09
		Grupo Teste	Confiabilidade	-0,03 ( $\pm 0,07$ )	0,02 ( $\pm 0,05$ )	-0,00 ( $\pm 0,05$ )	0,02 ( $\pm 0,06$ )
			Limites de concordância	-0,17 a 0,11	-0,09 a 0,12	-0,10 a 0,09	-0,1 a 0,14

**Tabela 2.** Confiabilidade (média das diferenças entre as duas observações  $\pm$  desvio padrão) e limites de concordância das medições de área (em mm<sup>2</sup>) do segundo molar de amostras dos grupos controle e teste. Porto Alegre, 2002.

			Intacta	Erosão em Esmalte	Erosão em Dentina	Erosão Total	Total
Avaliador 1 (Medição 1 – Medição 2)	Grupo	Confiabilidade	0,00 ( $\pm 0,01$ )	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0,00 ( $\pm 0,01$ )
	Controle	Limites de concordância	-0,02 a 0,01	0	0	0	-0,02 a 0,01
	Grupo	Confiabilidade	-0,00 ( $\pm 0,02$ )	0,00 ( $\pm 0,04$ )	-0,01 ( $\pm 0,03$ )	-0,00 ( $\pm 0,02$ )	0,01 ( $\pm 0,03$ )
	Teste	Limites de concordância	-0,04 a 0,03	-0,07 a 0,08	-0,07 a 0,05	-0,04 a 0,03	-0,05 a 0,07
Avaliador 2 (Medição 1 – Medição 2)	Grupo	Confiabilidade	0 ( $\pm 0,00$ )	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 ( $\pm 0,00$ )
	Controle	Limites de concordância	-0,00 a 0,00	0	0	0	-0,00 a 0,00
	Grupo	Confiabilidade	0,00 ( $\pm 0,00$ )	0,00 ( $\pm 0,00$ )	0,00 ( $\pm 0,00$ )	0,00 ( $\pm 0,01$ )	0,00 ( $\pm 0,01$ )
	Teste	Limites de concordância	-0,01 a 0,01	-0,01 a 0,01	-0,01 a 0,01	-0,01 a 0,02	-0,01 a 0,02
Inter Avaliador (Medição 1 Avaliador 1 – Medição 1 Avaliador 2)	Grupo	Confiabilidade	-0,01 ( $\pm 0,02$ )	-0,00 ( $\pm 0,00$ )	-0,00 ( $\pm 0,00$ )	0 (0)	0,01 ( $\pm 0,02$ )
	Controle	Limites de concordância	-0,05 a 0,03	-0,02 a 0,01	-0,00 a 0,00	0	-0,05 a 0,03
	Grupo	Confiabilidade	-0,02 ( $\pm 0,06$ )	0,02 ( $\pm 0,07$ )	-0,01 ( $\pm 0,03$ )	0,01 ( $\pm 0,07$ )	-0,01 ( $\pm 0,05$ )
	Teste	Limites de concordância	-0,14 a 0,1	-0,12 a 0,16	-0,07 a 0,05	-0,13 a 0,15	-0,11 a 0,09

**Tabela 3.** Confiabilidade (média das diferenças entre as duas observações  $\pm$  desvio padrão) e limites de concordância das medições da soma da área (em mm<sup>2</sup>) do primeiro e do segundo molares de amostras dos grupos controle e teste. Porto Alegre, 2002.

			Intacta	Erosão em Esmalte	Erosão em Dentina	Erosão Total	Total
Avaliador 1 (Medição 1 – Medição 2)	Grupo	Confiabilidade	0,00 ( $\pm 0,1$ )	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0,00 ( $\pm 0,1$ )
	Controle	Limites de concordância	-0,19 a 0,20	0	0	0	-0,19 a 0,20
	Grupo	Confiabilidade	0,01 ( $\pm 0,04$ )	0,00 ( $\pm 0,06$ )	-0,01 ( $\pm 0,06$ )	-0,01 ( $\pm 0,06$ )	0,00 ( $\pm 0,07$ )
	Teste	Limites de concordância	-0,07 a 0,09	-0,11 a 0,12	-0,13 a 0,11	-0,13 a 0,11	-0,13 a 0,14
Avaliador 2 (Medição 1 – Medição 2)	Grupo	Confiabilidade	-0,00 ( $\pm 0,00$ )	0,00 ( $\pm 0,00$ )	0 (0)	0,00 ( $\pm 0,00$ )	0,00 ( $\pm 0,00$ )
	Controle	Limites de concordância	-0,00 a 0,00	-0,00 a 0,00	0	-0,00 a 0,00	-0,01 a 0,01
	Grupo	Confiabilidade	0,0 ( $\pm 0,01$ )	0 ( $\pm 0,00$ )	0,00 ( $\pm 0,01$ )	0,00 ( $\pm 0,01$ )	0,00 ( $\pm 0,02$ )
	Teste	Limites de concordância	-0,01 a 0,02	-0,00 a 0,00	-0,01 a 0,02	-0,01 a 0,02	-0,03 a 0,04
Inter Avaliador (Medição 1 Avaliador 1 – Medição 1 Avaliador 2)	Grupo	Confiabilidade	-0,00 ( $\pm 0,1$ )	-0,00 ( $\pm 0,01$ )	-0,00 ( $\pm 0,00$ )	-0,00 ( $\pm 0,01$ )	-0,13 ( $\pm 0,38$ )
	Controle	Limites de concordância	-0,19 a 0,20	-0,02 a 0,01	-0,00 a 0,00	-0,02 a 0,01	-0,89 a 0,63
	Grupo	Confiabilidade	-0,06 ( $\pm 0,12$ )	0,05 ( $\pm 0,11$ )	-0,02 ( $\pm 0,07$ )	0,03 ( $\pm 0,12$ )	-0,03 ( $\pm 0,11$ )
	Teste	Limites de concordância	-0,3 a 0,18	-0,17 a 0,27	-0,16 a 0,12	-0,21 a 0,27	-0,25 a 0,19

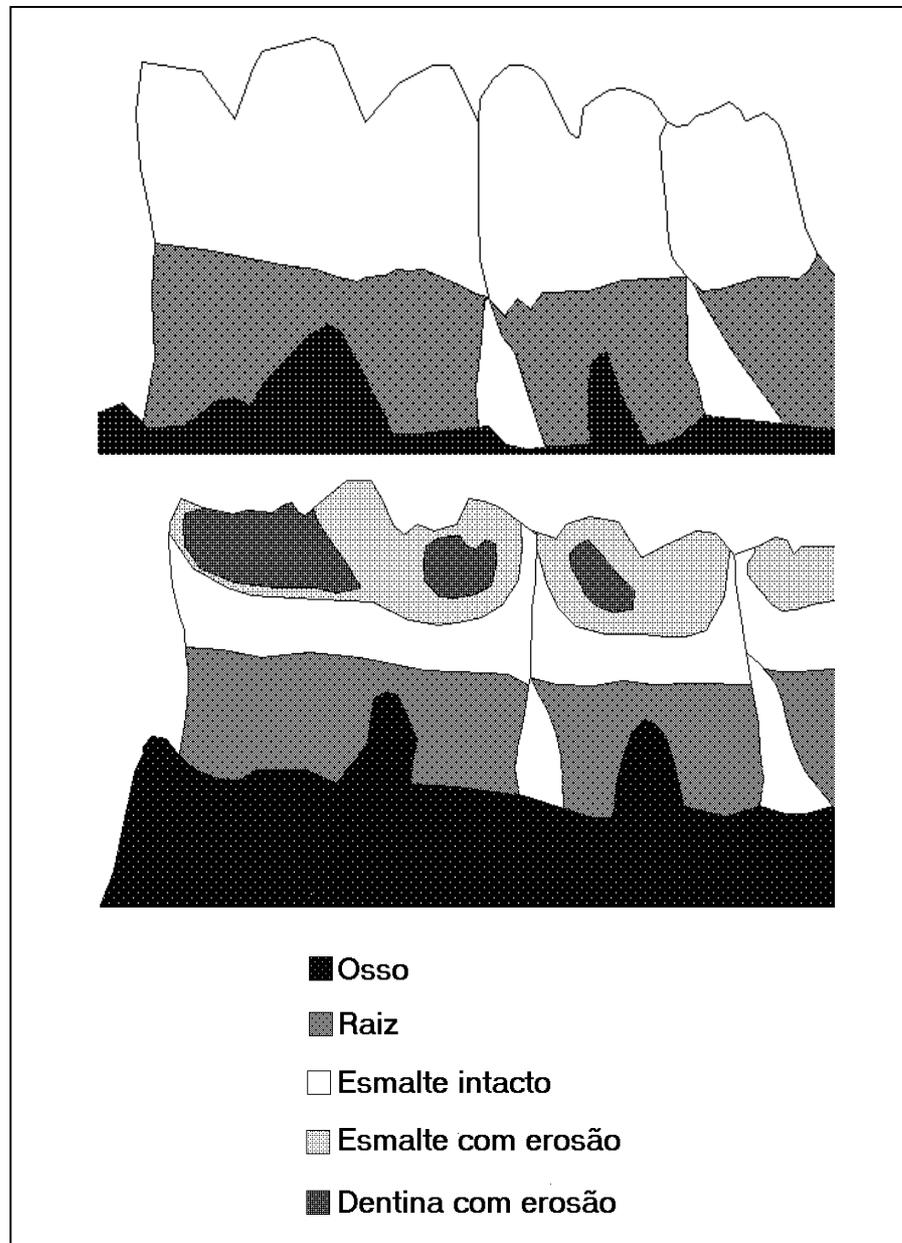
**Tabela 4.** Valores médios ( $\pm$  desvio-padrão) das variáveis avaliadas nas amostras dos grupos controle e teste pelo avaliador 1. Porto Alegre, 2002.

		Grupo	Área Intacta	Erosão em Esmalte	Erosão em Dentina	Erosão Total	Área Total
1° Molar	Medição 1	Controle	0,82 ( $\pm 0,07$ )	0,00 (0)	0 (0)	0 (0)	0,82 ( $\pm 0,07$ )
		Teste	0,32 ( $\pm 0,12$ )	0,23 ( $\pm 0,11$ )	0,17 ( $\pm 0,1$ )	0,41 ( $\pm 0,09$ )	0,73 ( $\pm 0,12$ )
	Medição 2	Controle	0,82 ( $\pm 0,07$ )	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0,82 ( $\pm 0,07$ )
		Teste	0,31 ( $\pm 0,11$ )	0,24 ( $\pm 0,1$ )	0,18 ( $\pm 0,1$ )	0,42 ( $\pm 0,09$ )	0,74 ( $\pm 0,12$ )
2° Molar	Medição 1	Controle	0,43 ( $\pm 0,03$ )	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0,43 ( $\pm 0,03$ )
		Teste	0,18 ( $\pm 0,07$ )	0,15 ( $\pm 0,06$ )	0,07 ( $\pm 0,07$ )	0,22 ( $\pm 0,06$ )	0,41 ( $\pm 0,05$ )
	Medição 2	Controle	0,43 ( $\pm 0,04$ )	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0,43 ( $\pm 0,04$ )
		Teste	0,17 ( $\pm 0,07$ )	0,14 ( $\pm 0,05$ )	0,08 ( $\pm 0,07$ )	0,22 ( $\pm 0,06$ )	0,40 ( $\pm 0,06$ )
1° + 2° Molares	Medição 1	Controle	1,27 ( $\pm 0,14$ )	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1,27 ( $\pm 0,14$ )
		Teste	0,5 ( $\pm 0,18$ )	0,39 ( $\pm 0,16$ )	0,24 ( $\pm 0,17$ )	0,63 ( $\pm 0,14$ )	1,14 ( $\pm 0,17$ )
	Medição 2	Controle	1,26 ( $\pm 0,1$ )	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1,26 ( $\pm 0,1$ )
		Teste	0,49 ( $\pm 0,17$ )	0,38 ( $\pm 0,13$ )	0,26 ( $\pm 0,16$ )	0,65 ( $\pm 0,14$ )	1,15 ( $\pm 0,16$ )

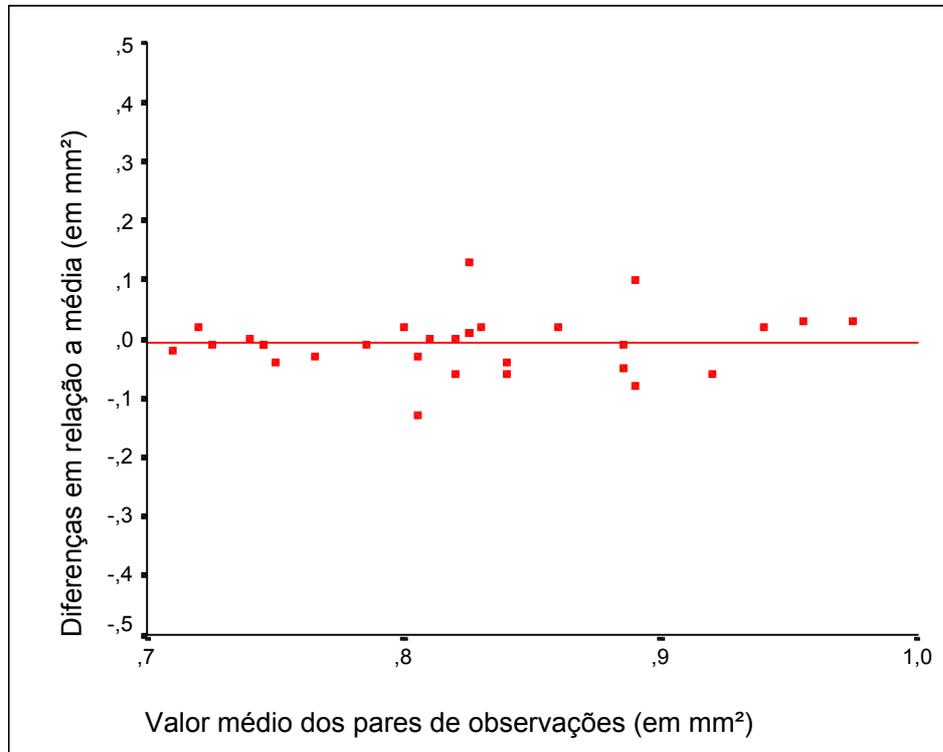
**Tabela 5.** Valores médios ( $\pm$  desvio-padrão) das variáveis avaliadas nas amostras dos grupos controle e teste pelo avaliador 2. Porto Alegre, 2002.

		Grupo	Área Intacta	Erosão em Esmalte	Erosão em Dentina	Erosão Total	Área Total
1° Molar	Medição 1	Controle	0,81 ( $\pm$ 0,05)	0,00 ( $\pm$ 0,00)	0 (0)	0,00 ( $\pm$ 0,00)	0,82 ( $\pm$ 0,05)
		Teste	0,35 ( $\pm$ 0,09)	0,21 ( $\pm$ 0,09)	0,18 ( $\pm$ 0,1)	0,39 ( $\pm$ 0,1)	0,75 ( $\pm$ 0,1)
	Medição 2	Controle	0,81 ( $\pm$ 0,05)	0,00 ( $\pm$ 0,00)	0 (0)	0,00 ( $\pm$ 0,01)	0,82 ( $\pm$ 0,05)
		Teste	0,35 ( $\pm$ 0,09)	0,21 ( $\pm$ 0,09)	0,18 ( $\pm$ 0,1)	0,39 ( $\pm$ 0,1)	0,75 ( $\pm$ 0,11)
2° Molar	Medição 1	Controle	0,45 ( $\pm$ 0,04)	0,00 ( $\pm$ 0,00)	0,00 ( $\pm$ 0,00)	0,00 ( $\pm$ 0,00)	0,45 ( $\pm$ 0,04)
		Teste	0,21 ( $\pm$ 0,09)	0,12 ( $\pm$ 0,07)	0,08 ( $\pm$ 0,07)	0,21 ( $\pm$ 0,1)	0,42 ( $\pm$ 0,06)
	Medição 2	Controle	0,45 ( $\pm$ 0,04)	0,00 ( $\pm$ 0,00)	0,00 ( $\pm$ 0,00)	0,00 ( $\pm$ 0,00)	0,45 ( $\pm$ 0,04)
		Teste	0,21 ( $\pm$ 0,09)	0,12 ( $\pm$ 0,07)	0,08 ( $\pm$ 0,07)	0,21 ( $\pm$ 0,1)	0,42 ( $\pm$ 0,06)
1° + 2° Molares	Medição 1	Controle	1,27 ( $\pm$ 0,09)	0,00 ( $\pm$ 0,01)	0,00 ( $\pm$ 0,00)	0,00 ( $\pm$ 0,01)	1,27 ( $\pm$ 0,09)
		Teste	0,57 ( $\pm$ 0,17)	0,33 ( $\pm$ 0,15)	0,26 ( $\pm$ 0,17)	0,60 ( $\pm$ 0,18)	1,17 ( $\pm$ 0,14)
	Medição 2	Controle	1,27 ( $\pm$ 0,09)	0,00 ( $\pm$ 0,01)	0,00 ( $\pm$ 0,00)	0,00 ( $\pm$ 0,01)	1,27 ( $\pm$ 0,09)
		Teste	0,57 ( $\pm$ 0,17)	0,33 ( $\pm$ 0,15)	0,26 ( $\pm$ 0,17)	0,60 ( $\pm$ 0,18)	1,17 ( $\pm$ 0,15)

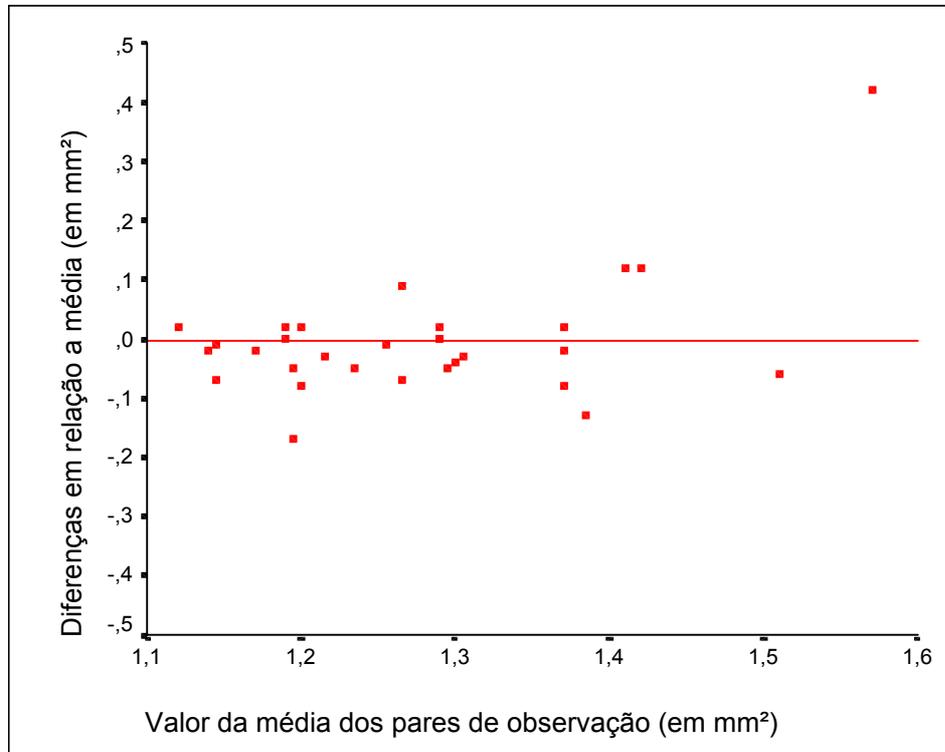
**Figura 1.** Desenho esquemático das medições realizadas nos camundongos dos grupos controle e teste, respectivamente. Porto Alegre, 2002.



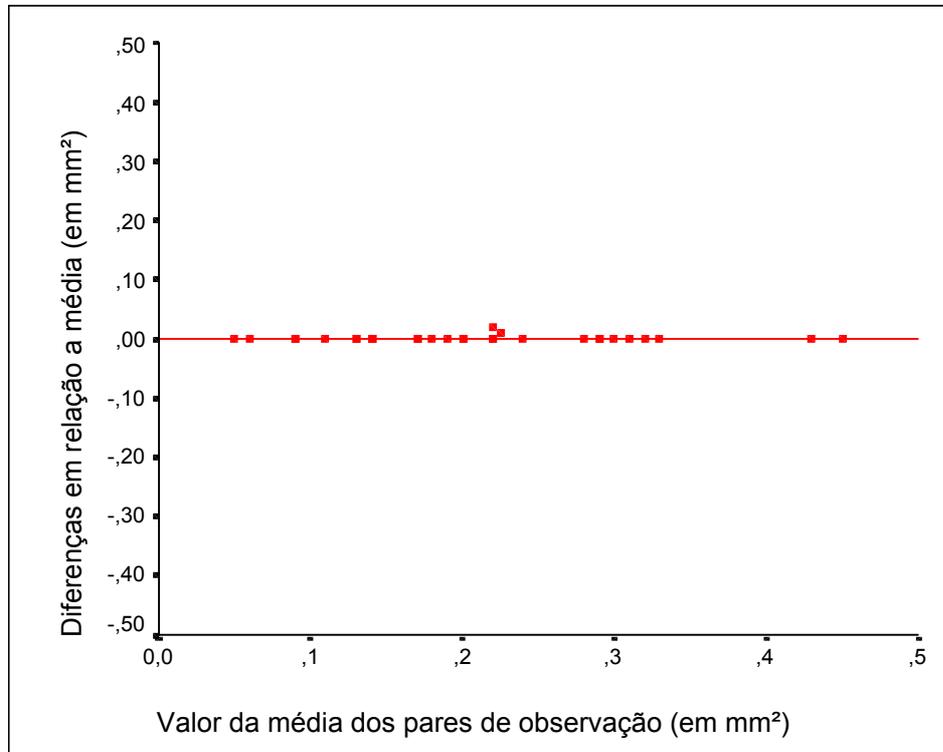
**Gráfico 1.** Plotagem das diferenças para cada par de observações contra os valores médios dos pares de observações, na variável Área Intacta, medições intraexaminador 1 efetuadas no 1º molar, em amostras do grupo controle. Porto Alegre 2002.



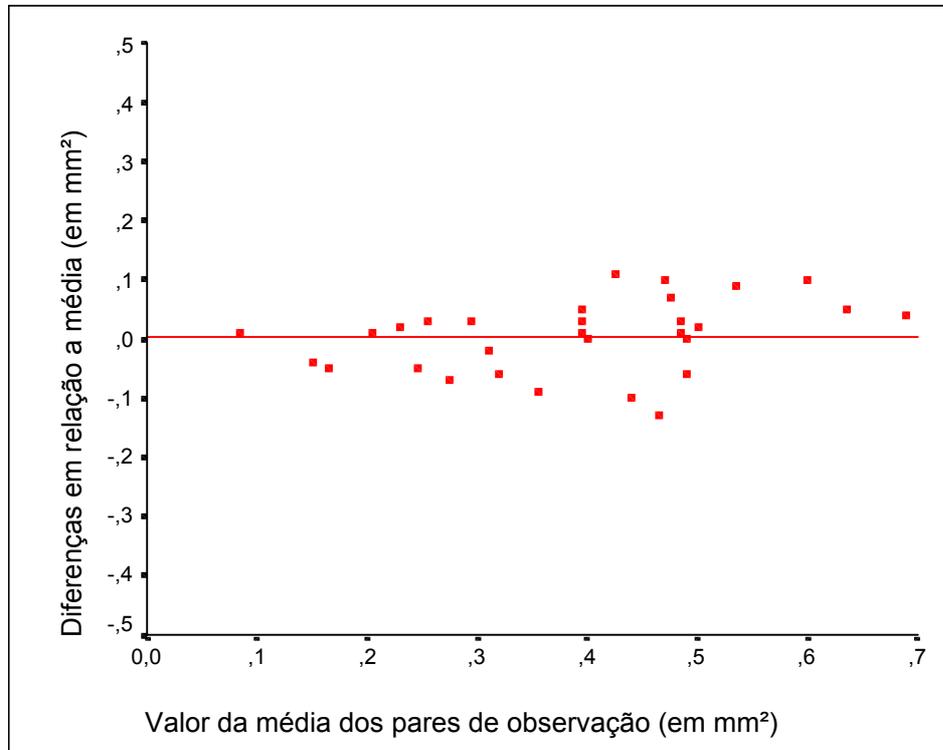
**Gráfico 2.** Plotagem das diferenças para cada par de observações contra os valores médios dos pares de observações, na variável Área Total, medições interexaminador resultado da soma de 1º e 2º molares, em amostras do grupo controle. Porto Alegre 2002.



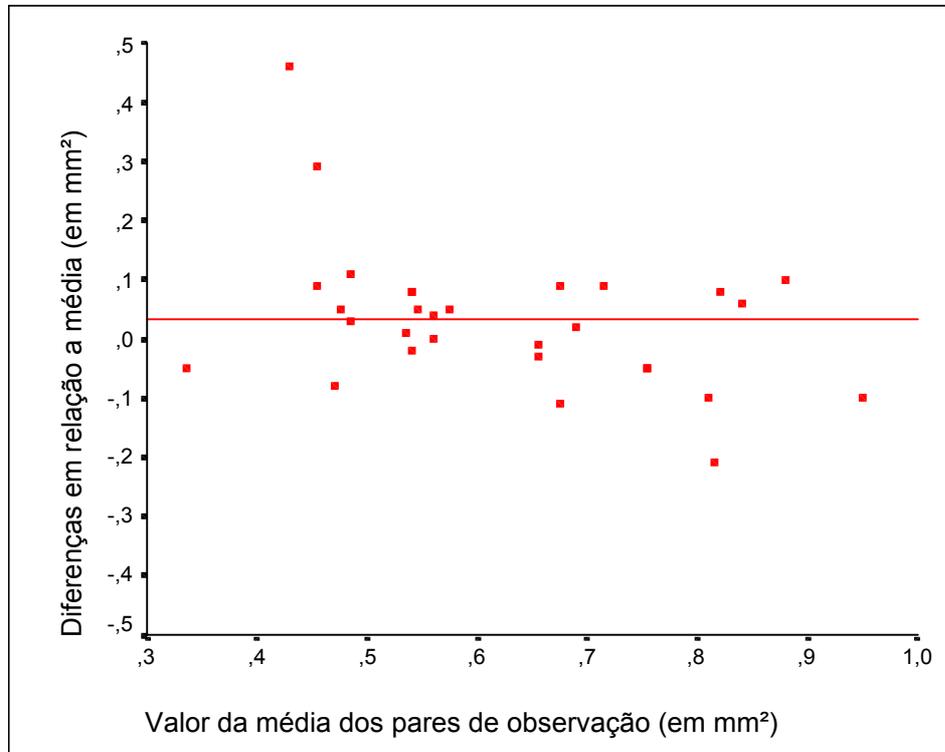
**Gráfico 3.** Plotagem das diferenças para cada par de observações contra os valores médios dos pares de observações, na variável Área Erosão em Esmalte, medições intraexaminador 2 efetuadas no 1º molar, em amostras do grupo teste. Porto Alegre 2002.



**Gráfico 4.** Plotagem das diferenças para cada par de observações contra os valores médios dos pares de observações, na variável Área Erosão em Esmalte, medições intraexaminador 1 resultado da soma de 1º e 2º molares, em amostras do grupo teste. Porto Alegre 2002.



**Gráfico 5.** Plotagem das diferenças para cada par de observações, na variável Área Erosão em Total, medições interexaminador resultado da soma de 1º e 2º molares, em amostras do grupo teste. Porto Alegre 2002.



## 8. ARTIGO 3

HUGO F. N., AMENÁBAR J. M., PADILHA D. M. P. Erosão dentária em camundongos velhos submetidos ao consumo de vinho.

Artigo formatado de acordo com as instruções para autores da Revista Pesquisa Odontológica Brasileira, publicação da Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica e da Universidade de São Paulo, que está indexada nas bases de dados: LILACS, Bibliografia Brasileira de Odontologia, Biological Abstract, Index Medicus, Index to Dental Literature, MEDLARS, Medline, PubMed, The Serials Directory e Ulrich's.

## **8.1. PRELIMINARES**

### **8.1.1. Cabeçalho.**

Erosão dentária em camundongos velhos submetidos ao consumo de vinho.

Dental erosion in aged mice submitted to wine consumption.

Fernando Neves Hugo<sup>1</sup>, José Miguel Amenábar<sup>1</sup>, Dalva Maria Pereira Padilha<sup>2,3</sup>

### **8.1.2. Referência Bibliográfica.**

HUGO F. N., AMENÁBAR J. M., PADILHA D. M. P. Erosão dentária em camundongos velhos submetidos ao consumo de vinho.

### **8.1.3. Resumo.**

Entre os agentes causais cujo potencial erosivo é significativo estão bebidas como o vinho e entre os modificadores a saliva. O objetivo deste estudo foi avaliar o desenvolvimento de erosões dentárias em camundongos velhos submetidos ao consumo de vinho e com o fluxo salivar diminuído. Neste estudo foram utilizados 60 camundongos distribuídos nos grupos Água, Água e Atropina, Vinho, e Vinho e Atropina. Aos animais dos grupos Água e Atropina e Vinho e Atropina o sulfato de atropina foi administrado pela via oral em dose de aproximadamente 45 mg/kg/dia. No décimo quinto, no trigésimo e no quadragésimo quinto dias do experimento cinco animais de cada grupo eram sacrificados. Suas hemi-mandíbulas foram removidas, coradas e fotografadas sob aumento para avaliação das áreas total; intacta; de erosão em esmalte; de erosão em dentina A confiabilidade das medições foi considerada excelente. As médias de Área Intacta dos grupos Água e Água e Atropina foram sempre significativamente maiores que as médias dos grupos Vinho e Vinho e Atropina, enquanto as

---

<sup>1</sup> Mestrando do Programa de Pós-Graduação em Gerontologia Biomédica da PUCRS.

<sup>2</sup> Professora Doutora do Programa de Pós-Graduação em Gerontologia Biomédica da PUCRS.

médias de Erosão em Esmalte e em Dentina destes foram sempre significativamente maiores do que a dos grupos Água e Água e Atropina. As médias de Área Total não foram, na maioria das vezes, significativamente diferentes entre si. O valor médio de Erosão em Esmalte ao 15 dias do grupo Vinho foi significativamente menor que a do grupo Vinho e Atropina. O efeito erosivo do vinho tinto testado pode ser considerado significativo, assim como o efeito da supressão farmacológica da secreção salivar com atropina, que apesar de discreto, também foi importante neste modelo.

#### **8.1.4. Unitermos.**

Atropina, Camundongos, Saliva, Erosão do dente, Vinho.

## **8.2. TEXTO**

### **8.2.1. Introdução.**

#### 8.2.1.1. Conceituação.

Erosão é um termo que deriva do verbo latim *erodere, erosi, erosum* (corroer), e descreve o processo de destruição gradual da face de algo, geralmente por processos eletrolíticos ou químicos <sup>1</sup>. O termo clínico erosão dentária é utilizado para descrever os resultados físicos de uma perda crônica, patológica e localizada do tecido mineralizado das faces dentárias, sem envolvimento bacteriano e onde o agente causal é, de modo geral, um ácido <sup>2,3</sup>.

#### 8.2.1.2. Etiopatogênese das erosões dentárias.

As lesões de erosão na superfície de esmalte ocorrem devido a uma desmineralização química causada por líquidos subsaturados em relação a hidróxido e a fluorapatita, e cuja cinética de dissolução está relacionada a reações controladas pelo grau de difusibilidade dos ácidos em solução <sup>4</sup>. Elas são denominadas extrínsecas quando os ácidos, como os da dieta ou

do ambiente de trabalho, são de origem exógena; intrínsecas, quando o ácido que as causa é de origem endógena, como o proveniente do suco gástrico em casos de indivíduos portadores de refluxo gastroesofágico; ou idiopáticas, quando não se conhece a origem do ácido que provocou erosão dentária <sup>1</sup>.

#### 8.2.1.3. Agentes causais e modificadores das erosões dentárias.

Os ácidos presentes nos alimentos que compõe nossa dieta são os agentes causais mais comuns de erosão dentária <sup>1</sup>. Evidências de experimentos *in vitro* e *in vivo* dão conta do significativo potencial erosivo de diversos destes componentes da dieta, entre os quais já foram identificados: sucos naturais e industrializados de laranja, limão, maçã, toranja; refrigerantes de limão, laranja e cola; bebidas alcoólicas como o vinho; bebidas isotônicas; colutórios; e aspirina <sup>5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13</sup>.

Das evidências obtidas a partir de relatos de caso e estudos observacionais a presença de erosões foi associada a fatores causais como consumo de: suco de frutas cítricas <sup>14</sup>, frutas cítricas <sup>14</sup>, vitamina C mastigável, bebidas alcoólicas <sup>15, 16, 17, 18</sup>, refrigerantes <sup>14</sup>, bebidas isotônicas <sup>14</sup>, dieta predominantemente composta por alimentos ácidos <sup>19</sup>, entre outros. Outros relatos de casos e estudos observacionais indicaram que as erosões dentárias são lesões comuns em populações/indivíduos alcoolistas <sup>17, 18</sup>, provadores de vinho profissionais <sup>12, 20</sup> e indivíduos vegetarianos ou cuja dieta é predominantemente composta por alimentos crus <sup>19, 21</sup>.

Regurgitação gástrica <sup>14, 19</sup>, também quando associada ao consumo excessivo de frutas e de suco de frutas <sup>2</sup> e vômitos crônicos <sup>14</sup>, do mesmo modo foram descritos como fatores causais de erosão dentária. O fluxo salivar foi, dentre os fatores modificadores, também associado à erosões dentárias <sup>14, 20</sup>.

#### 8.2.1.4. Saliva como modificadora de erosão dentária.

A saliva exerce várias funções de proteção contra a erosão dentária. Entre elas estão: capacidade de neutralização; os sistemas tampão; capacidade de manter supersaturação pela presença de cálcio e fosfato; a formação da película salivar, que tem a capacidade de proteger a superfície do esmalte de desmineralização; e a presença de cálcio, fosfato e fluoretos, fundamentais nos processos de remineralização <sup>22</sup>.

Alguns estudos *in vitro* avaliaram a associação entre desmineralização da superfície do esmalte e a formação de película salivar. Resultados destes experimentos seja quando a película fora formada *in vitro*<sup>23</sup> seja quando *in situ*<sup>8, 24</sup>, indicam que ela exerceu algum grau de proteção sobre o esmalte exposto a ácidos. Nos estudos observacionais, como já foi descrito anteriormente, a presença e a severidade de erosões dentárias esteve significativamente associada à presença de um baixo fluxo salivar, estimulado ou não; e a capacidade tampão da saliva<sup>14, 20, 21</sup>.

#### 8.2.1.5. Vinho e erosão dentária.

Vinhos brancos<sup>11, 12</sup>; tintos; de cereja e espumantes, todas elas bebidas alcoólicas de baixos pH e capacidade tampão, são capazes de promover erosão do esmalte *in vitro*<sup>11, 26</sup>. Quando a liberação de fosfato por blocos de esmalte imerso nos vinhos foi medida, ela apresentou um aumento linear em função do tempo de exposição<sup>11</sup>.

Evidências de um relato de caso<sup>12</sup> e de um estudo de prevalência sueco<sup>20</sup> indicam que provadores de vinho são profissionais sob grande probabilidade de desenvolvimento de erosões dentárias severas<sup>12, 20</sup>, e que entre os fatores associados à presença dessas lesões estão o tempo como provador profissional e a presença de um baixo fluxo salivar não estimulado<sup>20</sup>.

#### 8.2.1.6. Evidências obtidas de modelos animais.

Modelos animais, especificamente roedores, têm sido utilizados com sucesso na investigação dos agentes causais da doença cárie como os microorganismos; de agentes moduladores como o flúor e a dieta; e de agentes modificadores importantes como o fluxo salivar<sup>26, 27, 28</sup>. Estes experimentos, realizados sob condições padronizadas de laboratório, permitiram que vários aspectos fundamentais desta doença fossem investigados.

Uma rápida consulta as bases de dados OLD MEDLINE e MEDLINE no site NLM GATEWAY (<http://gateway.nlm.nih.gov/gw/Cmd>) com os termos: dental caries, rat, mice, hamster e rodent resulta em mais de 1500 artigos publicados, indicando a tradição do uso de roedores como modelo experimental para investigação da doença cárie. Entretanto, se o termo

dental caries é substituído pelo termo tooth erosion na consulta destas mesmas bases de dados o resultado da pesquisa mostra menos do que quarenta artigos publicados.

Estes poucos experimentos de erosão dentária em roedores dedicaram-se à investigação do papel de fatores causais como sucos<sup>29</sup> e bebidas esportivas<sup>30, 31</sup>; e de fatores moduladores como o flúor<sup>30, 31</sup> no desenvolvimento de erosão dentária. Entre os métodos empregados pelos pesquisadores estão microscopia eletrônica de varredura<sup>31</sup> e análise histomorfométrica<sup>29, 32</sup> das erosões formadas. Como resultado, estes experimentos mostraram que o potencial destes componentes da dieta<sup>29, 30, 31</sup> como agentes causais de erosão dentária, e o impacto da modificação experimental destes agentes sobre o desenvolvimento destas lesões<sup>30</sup> foi significativo. Não há, porém, até o presente momento, experimento que tenha verificado o papel da associação entre agentes causais, como os da dieta, e agentes modificadores, como o fluxo salivar alterado pelo consumo de fármaco, no estabelecimento e na progressão de erosões dentárias nesses modelos animais.

#### 8.2.1.7. Erosões dentárias e envelhecimento.

O acesso ao flúor e a medidas preventivas de combate às cáries resultará num aumento significativo no número médio de dentes por indivíduo, inclusive entre as faixas etárias mais elevadas da população<sup>33</sup>. Há uma percepção geral de que os desgastes dentários, como abrasão, atrição e erosão, estão aumentando devido à associação entre a retenção dos dentes em boca por períodos mais prolongados e os componentes da dieta moderna, como os ácidos utilizados na constituição e conservação de alimentos industrializados. Mas, apesar da importância da dieta na etiologia dos desgastes dentários ser reconhecida, é pouco entendida, e faz destes desgastes, como as erosões dentárias, um problema de crescente preocupação<sup>34</sup>, principalmente nessa parcela da população.

Nosso objetivo foi, portanto, avaliar o desenvolvimento de erosões dentárias em camundongos velhos submetidos ao consumo de vinho e com o fluxo salivar alterado.

### **8.2.2. Material e Métodos.**

#### 8.2.2.1. Animais e dieta.

Neste estudo foram utilizados 60 camundongos *mus domesticus domesticus* machos, da linhagem cf1, com doze meses de idade no início do experimento. Os camundongos foram aleatoriamente distribuídos entre os grupos **Água** (controle negativo), **Água e Atropina** (controle positivo), **Vinho** (experimental 1), e **Vinho e Atropina** (experimental 2).

Os animais do grupo Água consumiram água destilada e ração comercial *ad libitum*; os do grupo Água e Atropina, água destilada a qual foi adicionado sulfato de atropina e ração comercial *ad libitum*; os camundongos do grupo Vinho, vinho tinto (Garibaldi tinto seco, Cooperativa Vinícola Garibaldi) e ração comercial *ad libitum*; e os do grupo Vinho e Atropina, vinho tinto (Garibaldi tinto seco, Cooperativa Vinícola Garibaldi) ao qual foi adicionado sulfato de atropina e ração comercial *ad libitum*, ao longo da período experimental.

Os camundongos utilizados neste experimento foram obtidos, alojados e manipulados no biotério da Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde do Estado Rio Grande do Sul (FEPPS). O protocolo deste experimento foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Saúde do Hospital São Lucas da PUCRS. Durante o período experimental os camundongos foram alojados em gaiolas individuais e mantidos sob condições controladas de iluminação (12 horas de luz/ 12 horas de escuridão) e temperatura (aproximadamente 20°C). A preparação, troca e verificação do consumo dos líquidos e o abastecimento das gaiolas com ração foram efetuados pelo menos duas vezes por semana, e o peso dos camundongos foi verificado semanalmente, durante todo o período de realização do experimento, pelos pesquisadores responsáveis (FN Hugo, JM Amenábar). A limpeza semanal das gaiolas foi realizada pelos tratadores do biotério da FEPPS.

O pH dos líquidos oferecidos aos animais foi medido (HI98103 Checker 1, Hanna Instruments) no momento em que as garrafas eram cheias e no momento em que eram esvaziadas. Estas medições foram realizadas para que se verificasse a existência de diferenças significativas entre o pH do início e do final dos períodos entre as trocas, que eram realizadas duas vezes por semana ao longo da fase experimental.

#### 8.2.2.2. Cronograma do experimento.

No décimo quinto, no trigésimo e no quadragésimo quinto dias do experimento cinco animais de cada um dos grupos eram selecionados aleatoriamente e mortos no laboratório da FEPPS, compondo assim os três períodos experimentais (para detalhes ver Tabela 1).

#### 8.2.2.3. Sulfato de atropina.

O sulfato de atropina é uma droga antimuscarínica antagonista competitiva da acetilcolina<sup>35</sup>, que ocorre como um cristal sólido branco e incolor altamente solúvel em água e álcool. É incompatível com precipitantes alcalinos e decompõe-se em soluções ácidas<sup>36</sup>. Sua ação, devido a sua afinidade pelos receptores colinérgicos muscarínicos<sup>35</sup>, se dá pelo impedimento do acesso da acetilcolina e pela ocupação de receptores presentes nos músculos lisos, no músculo cardíaco e em várias células glandulares<sup>37</sup>.

Em ratos a administração crônica de atropina, numa dose que variou entre 23 e 45 mg/kg, resultou num menor fluxo salivar estimulado pelo uso de pilocarpina, quando comparado ao de animais que tiveram suas glândulas salivares ligadas. Neste último grupo os ratos necessitaram de apenas uma dose de pilocarpina para que se estimulasse secreção salivar, enquanto os animais que receberam atropina necessitaram de um número significativamente maior de doses para estimular a secreção salivar. Os resultados deste estudo indicam que a administração de atropina resulta em diminuição importante do fluxo salivar em roedores<sup>27</sup>.

Aos animais dos grupos Água e Atropina e Vinho e Atropina o sulfato de atropina (Sulfato de Atropina, Henrifarma) foi administrado pela via oral em dose de aproximadamente 45 mg/kg/dia<sup>27</sup> por animal. O fármaco foi associado à água ou vinho tinto, oferecidos nas garrafas das gaiolas, por meio da adição de uma solução de sulfato de atropina de concentração conhecida, preparada a cada semana do experimento. A associação administrada correspondeu à equação: peso médio estimado dos animais no início do experimento X dose por quilo / volume médio de líquido consumido por dia por animal + quantidade suficiente de solução de concentração conhecida.

#### 8.2.2.4. Processamento e análise das amostras.

A técnica de processamento e análise das amostras foi a descrita no artigo 2 desta dissertação. Brevemente, ao final de cada período experimental os camundongos foram anestesiados (ketamina 100g/l (Francotar, Virbac) + solução aquosa 2% de cloridrato de 2-(2,6-xilidino)-5,6-dihidro-4-H-1,3-tiazina (Rompun, Bayer), na proporção 1:1, em dose de 1,0ml/kg), e sacrificados por meio de decapitação. As mandíbulas foram cuidadosamente removidas e separadas nas metades. As metades direitas foram fixadas em formalina tamponada 10 % por pelo menos 48 horas e dissecadas até que se removesse todo o tecido mole, sendo após armazenadas em formalina tamponada 10% até o uso.

Cada hemi-mandíbula teve as faces linguais dos molares pinceladas com azul de toluidina para que se evidenciassem os limites de esmalte, dentina, cemento e osso. Elas foram então fotografadas num estereomicroscópio (B201, Olympus) sob condições de aumento, iluminação e posição, padronizadas, com filme fotográfico convencional (Kodak Ultra 135 ASA 100).

As fotografias obtidas a partir do processamento descrito foram digitalizadas com o auxílio de um scanner de mesa (Epson Expression 636) e avaliadas com o software de análise de imagens UTHSCSA Image Tool versão 2.02 (disponível para download no endereço: <http://ddsdx.uthscsa.edu/dig/download.html>). Foram realizadas medidas de: área total; área intacta; área de erosão em esmalte; e área de erosão em dentina <sup>32</sup> (Figuras 1 e 2). Os resultados foram expressos em mm<sup>2</sup>. Estas variáveis foram avaliadas por um examinador previamente treinado e que desconhecia o grupo ao qual pertenciam as amostras que lhe foram apresentadas. Para que se verificasse a confiabilidade dos dados, foram realizadas duas medições, com intervalos de duas semanas entre elas. Os valores utilizados para fins de análise estatística correspondem ao valor médio destas duas medições.

#### 8.2.2.5. Análise estatística.

A existência de diferença significativa entre as médias do peso inicial, do peso final, e do consumo diário de líquidos entre os grupos foi verificada com o teste ANOVA. As médias dos pesos inicial e final para cada grupo em cada período experimental foram comparadas por meio do teste t de Student pareado. As médias dos pHs do início e do final dos períodos entre as trocas dos líquidos das garrafas foram comparadas com o teste ANOVA. A existência de diferenças significativas para os valores das áreas: Total, Intacta, de Erosão em Esmalte, e de

Erosão em Dentina entre os diferentes grupos experimentais (Água, Água e Atropina, Vinho e Vinho e Atropina) foram verificadas por meio do teste ANOVA. As diferenças entre pares individuais de grupos foram verificadas com o teste *post hoc* de Tukey. Diferenças significativas entre os valores das áreas num mesmo grupo em diferentes períodos experimentais (15°, 30° ou 45° dia) foram verificadas com o teste de Friedman. Diferenças entre pares de períodos experimentais foram verificadas com o teste t de Student pareado. O valor estabelecido para rejeição da hipótese nula foi  $p < 0,05$ . O software utilizado para as análises estatísticas foi o SPSS versão 9.0.

A confiabilidade da metodologia proposta foi expressa por meio: da plotagem das diferenças para cada par observação contra os valores médios dos pares de observações intra e interexaminador realizadas; das médias e dos desvios-padrão das diferenças intra e interexaminador das medições (confiabilidade); e dos limites de concordância entre as observações intra e entre os avaliadores<sup>38, 39</sup>.

### **8.2.3. Resultados.**

#### 8.2.3.1. Confiabilidade

A confiabilidade das medições realizadas pelo examinador foi considerada excelente. Os valores das médias das diferenças para os pares de medições efetuadas foram, para todas as variáveis investigadas, próximos de zero, assim como seus desvios-padrão (dados no artigo 2, confiabilidade intraexaminador 2), indicando com isso a consistência do método e dos dados utilizados para que se realizassem as análises estatísticas.

#### 8.2.3.2. pH dos líquidos.

O pH médio quando da preparação das garrafas com água foi 7,23; com água + atropina 7,09; com vinho 2,97; e com vinho e atropina foi 3,14; já pH médio ao final dos períodos de trocas no grupo água foi 7,3; no água + atropina 7; no vinho 2,94; e no vinho e atropina foi 2,97. Não houve diferenças significativas entre os valores iniciais e finais de pH nos grupos, teste ANOVA.

### 8.2.3.3. Peso e consumo de líquido.

Não houve diferença significativa entre os grupos Água, Água e Atropina, Vinho e Vinho e Atropina nas médias dos pesos (peso em gramas  $\pm$  desvio padrão) iniciais e nas dos pesos finais, nos diferentes períodos experimentais, teste ANOVA (Tabela 2). Entretanto as diferenças entre as médias (peso em gramas  $\pm$  desvio padrão) do peso inicial e final, respectivamente, para um mesmo grupo diferiram significativamente entre si nos grupos: Água e Atropina, aos 15 dias, 45,66 ( $\pm$ 4,15) e 42,96 ( $\pm$ 2,93); Vinho, aos 15 dias 44,94 ( $\pm$ 3,47) e 42,4 ( $\pm$ 3,44), aos 30 dias 47,5 ( $\pm$ 6,90) e 40,82 ( $\pm$ 7,48), e aos 45 dias 47,2 ( $\pm$ 5,85) e 43,26 ( $\pm$ 5,61); e Vinho e Atropina, aos 15 dias 48,14 ( $\pm$ 4,19) e 42,54 ( $\pm$ 3,29), aos 30 dias 48,42 ( $\pm$ 3,77) e 39,04 ( $\pm$ 4,30), e aos 45 dias 47,74 ( $\pm$ 4,01) e 42,38 ( $\pm$ 3,37), teste t de Student pareado (Tabela 2). As diferenças médias entre os pesos final e inicial (peso final – peso inicial), em gramas, estão indicadas na Tabela 2.

O consumo médio diário de líquidos (em mililitros  $\pm$  desvio padrão) pelos animais dos diferentes grupos experimentais é mostrado na Tabela 2. Houve diferença significativa entre os grupos aos 15 dias, aos 30 dias e aos 45 dias, teste ANOVA. Testes *post hoc* de Tukey mostraram diferenças significativas entre o grupo Água e Atropina (7,90  $\pm$ (0,78)) e os Grupos Água (13,70 ( $\pm$ 5,68)) e Vinho e Atropina (13,80 ( $\pm$ 1,36)) aos 15 dias,  $p < 0,05$ ; e entre o grupo Água e Atropina (10,1 ( $\pm$ 1,39)) e os grupos Água (13,65 ( $\pm$ 0,59)), Vinho (13,19 ( $\pm$ 0,82)) e Vinho e Atropina (13,1 ( $\pm$ 0,55)) aos 45 dias,  $p < 0,01$ .

### 8.2.3.4. Medições de área.

Quando o tempo não foi considerado para fins de análise estatística e apenas as médias dos grupos, como um todo, foram consideradas houve diferenças significativas entre os grupos Água, Água e Atropina, Vinho e Vinho e Atropina para todas as variáveis avaliadas, teste ANOVA,  $p < 0,001$ . As médias das Áreas Intactas (em  $\text{mm}^2 \pm$  desvio padrão) dos Grupos Vinho (0,36 ( $\pm$ 0,11)) e Vinho e Atropina (0,35 ( $\pm$ 0,06)) foram significativamente menores que as médias dos grupos Água (0,83 ( $\pm$ 0,06)) e Água e Atropina (0,8 ( $\pm$ 0,04)), teste de Tukey,  $p < 0,001$ . Os valores médios de Erosão em Esmalte dos Grupos Vinho (0,18 ( $\pm$ 0,09)) e Vinho e Atropina (0,24 ( $\pm$ 0,09)) foram significativamente maiores do que as médias dos grupos Água (0,00 ( $\pm$ 0,00)) e Água e Atropina (0,00 ( $\pm$ 0,00)), teste de Tukey,  $p < 0,001$ . Da mesma forma as médias de Erosão em Dentina dos grupos Vinho (0,17 ( $\pm$ 0,10)) e Vinho e

Atropina (0,18 ( $\pm$ 0,11)) foram significativamente maiores do que a dos grupos Água (0 (0)) e Água e Atropina (0 (0)), teste de Tukey,  $p < 0,001$ . Já a média dos valores de Área Total do Grupo Vinho (0,72 ( $\pm$ 0,11)) foi significativamente menor que as dos grupos Água (0,83 ( $\pm$ 0,06)),  $p < 0,01$ ; e Água e Atropina (0,8 ( $\pm$ 0,04)),  $p < 0,05$ , teste de Tukey (Tabela 3).

#### 8.2.3.5. Área intacta.

As médias de Área Intacta dos diferentes grupos aos 15 dias, 30 dias e 45 dias foram significativamente diferentes entre si,  $p < 0,001$ , teste ANOVA (Tabela 4). Aos 15 dias, os valores médios das Áreas Intactas (em milímetros<sup>2</sup>  $\pm$  desvio padrão) dos grupos Vinho (0,43 ( $\pm$ 0,07)) e Vinho e Atropina (0,37 ( $\pm$ 0,05)) foram significativamente menores que as áreas dos grupos Água (0,88 ( $\pm$ 0,06)) e Água e Atropina (0,80 ( $\pm$ 0,05)), teste *post hoc* de Tukey,  $p < 0,001$ . Aos 30 dias, novamente, os valores médios das Áreas Intactas dos grupos Vinho (0,27 ( $\pm$ 0,12)) e Vinho e Atropina (0,32 ( $\pm$ 0,08)) foram significativamente menores que os valores médios das áreas dos grupos Água (0,78 ( $\pm$ 0,06)) e Água e Atropina (0,79 ( $\pm$ 0,03)), teste *post hoc* de Tukey,  $p < 0,001$ . Nos 45 dias também houve diferenças significativas entre os grupos. Os valores médios de Área Intacta dos grupos Vinho (0,38 ( $\pm$ 0,09)) e Vinho e Atropina (0,36 ( $\pm$ 0,05)) foram menores que os dos grupos Água (0,83 ( $\pm$ 0,03)) e Água e Atropina (0,81 ( $\pm$ 0,05)), teste de Tukey,  $p < 0,001$  (Tabela 4).

Houve diferença significativa entre os valores médios da Área Intacta do grupo Vinho nos diferentes períodos experimentais (15, 30 e 45 dias), teste de Friedman,  $p < 0,05$ . Testes t de Student pareados indicaram  $p = 0,59$  quando os pares 15 e 30 dias foram comparados (Tabela 4).

#### 8.2.3.6. Área de erosão em esmalte.

As médias das Áreas de Erosão em Esmalte dos grupos Água, Água e Atropina, Vinho, e Vinho e Atropina foram significativamente diferentes entre si aos 15, aos 30 e aos 45 dias do experimento,  $p < 0,001$ , teste ANOVA (Tabela 4). Diferenças significativas nas médias das Áreas de Erosão em Esmalte entre pares de grupos foram verificadas por meio do teste *post hoc* de Tukey. Aos 15 dias a Área média do grupo Vinho (0,14 ( $\pm$ 0,07)) foi significativamente maior que a dos grupos Água (0,00 ( $\pm$ 0,00)) e Água e Atropina (0,00 ( $\pm$ 0,00)) e significativamente menor que a do grupo Vinho e Atropina (0,27 ( $\pm$ 0,10)),  $p < 0,05$ ;

e a área de erosão em esmalte do grupo Vinho e Atropina (0,27 ( $\pm 0,10$ )) significativamente maior a dos grupos Água (0,00 ( $\pm 0,00$ )) e Água e Atropina (0,00 ( $\pm 0,00$ )),  $p < 0,001$ . Após 30 dias de experimento, os valores médios das Áreas Erosão em Esmalte dos grupos Vinho (0,22 ( $\pm 0,12$ )) e Vinho e Atropina (0,24 ( $\pm 0,08$ )) foram significativamente maiores que os valores médios dos grupos Água (0,00 ( $\pm 0,00$ )) e Água e Atropina (0,00 ( $\pm 0,00$ )), teste *post hoc* de Tukey,  $p < 0,01$ . Aos 45 dias, as Áreas de Erosão em Esmalte dos grupos Vinho (0,18 ( $\pm 0,08$ )) e Vinho e Atropina (0,19 ( $\pm 0,10$ )) foram significativamente maiores que as dos grupos Água (0,00 ( $\pm 0,00$ )) e Água e Atropina (0 (0)),  $p < 0,01$  (Tabela 4).

#### 8.2.3.7. Área de erosão em dentina.

Houve diferença significativa entre as médias das Áreas de Erosão em Dentina aos 15 dias,  $p < 0,01$ ; 30 dias,  $p < 0,01$ ; e 45 dias,  $p < 0,001$ , teste ANOVA (Tabela 4). O valor médio das Áreas de Erosão em Dentina nos grupos Água (0 (0)) e Água e Atropina (0 (0)) foi significativamente menor que os valores dos grupos Vinho (0,11 ( $\pm 0,08$ )) e Vinho e Atropina (0,12 ( $\pm 0,07$ )) aos 15 dias,  $p < 0,05$ , teste de Tukey; aos 30 dias, as médias dos grupos Água (0 (0)) e Água e Atropina (0 (0)) também foram significativamente diferentes das médias das áreas de Erosão em Dentina dos grupos Vinho (0,19 ( $\pm 0,10$ )) e Vinho e Atropina (0,18 ( $\pm 0,14$ )),  $p < 0,05$ , teste de Tukey; e aos 45 dias os valores médios dos grupos Água (0 (0)) e Água e Atropina (0 (0)), foram, do mesmo modo, significativamente menores que os valores dos grupos Vinho (0,21 ( $\pm 0,11$ )) e Vinho e Atropina (0,25 ( $\pm 0,10$ )), respectivamente,  $p < 0,01$  (Tabela 4).

#### 8.2.3.8. Área total.

As médias dos valores de Área Total foram significativamente diferentes entre os grupos aos 15 dias do período experimental, teste ANOVA,  $p < 0,05$ . Testes *post hoc* de Tukey revelaram diferenças significativas entre as médias da Área Total dos grupos Água (0,88 ( $\pm 0,07$ )) e Vinho (0,69 ( $\pm 0,11$ )),  $p < 0,05$  (Tabela 4).

### 8.2.4. Discussão.

Os três principais métodos para investigação de erosões dentárias são: sistemas *in vitro*, registro de erosão em animais de laboratório utilizados para pesquisa, e técnicas para verificação de erosão dentária no homem. Quando animais de laboratório foram utilizados como método, diversas foram as abordagens para avaliação das erosões dentárias. Entre elas análise de imagens digitais, microscopia eletrônica de varredura, análise semiquantitativa, e sistemas de escores (escalas ordinais) <sup>40</sup>. Os roedores foram utilizados como modelo neste experimento pela possibilidade do uso de um sistema *in vivo*, que permitiu uma avaliação quantitativa da erosão dentária em animais submetidos ao consumo de vinho tinto (agente causal) <sup>20</sup>, e de atropina, fármaco cuja ação supressora sobre o fluxo salivar (agente modificador) <sup>22</sup> é reconhecida em roedores <sup>27</sup>.

Soma-se a justificção anterior o fato de que o objetivo maior de um método deve ser, sem dúvida, certificação de sua reprodutibilidade, permitindo que as medições realizadas em diferentes tempos e sob diferentes circunstâncias possam ser comparadas <sup>40</sup>. No caso específico deste experimento a reprodutibilidade foi garantida pela boa precisão apresentada pelo método proposto, que permitiu a comparação segura dos dados obtidos a partir amostras de animais sacrificados nos diferentes grupos e períodos utilizados no experimento.

Quando da elaboração de um projeto de pesquisa que envolva animais, além dos cuidados peculiares a manutenção durante o experimento, também é importante considerar que o desenho experimental seja elaborado de tal forma que se utilize o menor número possível de animais que permita a obtenção de dados que sejam passíveis de análise estatística adequada <sup>41</sup>, e por este motivo, neste experimento, limitou-se o número de animais ao mínimo necessário para uma boa análise estatística. Animais velhos foram utilizados porque possibilitaram que diferenças fisiológicas observadas com o envelhecimento, que podem afetar a farmacocinética e a farmacodinâmica <sup>42</sup>, fossem introduzidas como parte deste modelo *in vivo* para avaliação de erosões dentárias e investigadas como parte de outro experimento conduzido pelo nosso grupo.

O pH dos líquidos fornecidos aos animais não sofreu modificações entre o período de preparo e abastecimento das garrafas e o de troca, indicando que o intervalo escolhido para a realização das mesmas (duas vezes por semana) esteve adequado, e que a estabilidade do pH dos líquidos fornecidos ao longo do período experimental foi mantida.

As diferenças no consumo de líquidos observadas entre o grupo Água e Atropina e os demais grupos do experimento refletem, provavelmente, diferenças no metabolismo dos camundongos provocadas pelo bloqueio dos receptores muscarínicos<sup>35, 37</sup>. As diferenças de peso podem ser consideradas resultado da mudança no ambiente dos animais. Quando do início do experimento, eles foram trocados de sala, partindo das de manutenção para as de experimentação, essas mudanças podem ser consideradas estressantes para o animal. Associa-se a este o fato de que, pela necessidade de controle do líquido ingerido durante o experimento, os animais foram transferidos de gaiolas com cinco animais para gaiolas individuais.

A administração de vinho, tanto aos animais do grupo Vinho como aos do grupo Vinho e Atropina, foi capaz de provocar o desenvolvimento de erosão dentária nas faces linguais dos molares após apenas 15 dias de exposição. Este efeito erosivo promovido pela adição de um agente causal a dieta de roedores é similar ao encontrado por outros pesquisadores<sup>29, 30</sup> após a adição de outros agentes como bebida isotônica, suco e refrigerante de laranja e suco de maçã quando do uso de roedores. A utilização do vinho tinto, entretanto, neste modelo *in vivo*, é inédita e constitui mais um sistema de avaliação do potencial erosivo desta bebida, juntamente com outros já propostos na literatura<sup>11, 20, 25</sup>.

Contudo, a comparação dos achados referentes ao agente causal, no presente experimento, com os achados de outros que avaliaram quantitativamente erosões dentárias em roedores é problemática tanto pela ausência, nos outros estudos, de estatística para verificação da reprodutibilidade dos resultados, como pelas diferenças nos protocolos de pesquisa e metodologia empregados para quantificação da erosão dentária<sup>43</sup><sup>41</sup>.

A adição do sulfato de atropina ao líquido de consumo dos animais visou a supressão farmacológica da produção de saliva, relacionada como modificadora de erosão dentária<sup>22</sup>. Esta droga foi escolhida porque sua ação é capaz de provocar abolição da secreção salivar mediada pelo parassimpático<sup>37</sup> em roedores<sup>27</sup>, por meio do antagonismo competitivo com a acetilcolina<sup>35</sup>; e porque sua dose em roedores, e uso como modelo para determinação dos efeitos da administração crônica de drogas que provocam hipossalivação são reconhecidos<sup>27</sup>. Igualmente, há que se destacar que fármacos com atividade anticolinérgica, como a atropina, são a causa principal de xerostomia<sup>44</sup>, e que a diminuição da produção de saliva, ao contrário

do que se imaginava, não está associada ao processo de envelhecimento, e sim ao consumo de fármacos ou disfunções como a Síndrome de Sjögren <sup>44</sup>.

Associam-se as questões discutidas no parágrafo anterior o fato de que em indivíduos cujo fluxo salivar é baixo e o consumo de fármacos significativo, há um maior grau de desmineralização dentária <sup>45</sup>. Por serem as erosões dentárias um problema de crescente preocupação entre populações idosas <sup>34</sup> a investigação do papel de drogas supressoras da produção de saliva sobre o desenvolvimento de erosões dentárias permitiria uma interessante abordagem do desfecho (erosão dentária) e de um importante agente modificador (saliva) juntamente com o agente causal (vinho).

Evidências de estudos observacionais <sup>14, 20</sup> que investigaram associação entre fluxo salivar e erosões dentárias; de estudos *in situ* <sup>8, 24</sup> e *in vitro* <sup>23</sup>, que avaliaram o papel da película salivar sobre erosão do esmalte; e de estudos experimentais em humanos <sup>45</sup>, e que investigaram a associação entre o fluxo salivar, consumo de medicamentos e grau de desmineralização dentária, indicam o significativo papel da saliva na proteção contra desmineralização. Os achados do presente experimento, quando comparados aos dos anteriores, podem ser considerados discretos, apesar das dificuldades da comparação entre estudos realizados em humanos e animais <sup>43</sup>. São, porém, indicativos do potencial de proteção provido pela saliva no desenvolvimento e progressão das erosões dentárias neste modelo experimental, encorajando o desenvolvimento de novos protocolos de pesquisa para melhor elucidar esta questão.

Especificamente, apenas na variável Erosão em Esmalte aos 15 dias a área de erosão foi significativamente maior no grupo Vinho Atropina que no Vinho (Tabela 4). Há, porém, que se destacar o interessante padrão de desmineralização observado ao longo do tempo no grupo Vinho e Atropina (Gráfico 1), que mostra um aumento da proporção da Área de Erosão em Dentina em relação à Área de Erosão em Esmalte. Este efeito, que não é observado no grupo Vinho (Gráfico 1), indica que nos animais do grupo Vinho e Atropina a severidade (aumento da área de dentina exposta) aumentou em função do tempo de exposição.

A interpretação de estudos animais é complicada pelas bem estabelecidas diferenças entre roedores e humanos. Além das diferenças nos mecanismos fisiológicos de beber, diferenças nas propriedades e composição da saliva e do esmalte podem afetar

significativamente o processo erosivo. O pH e a capacidade tampão da saliva de roedores são reconhecidamente diferentes da de humanos. A solubilidade e a morfologia dos dentes também são reconhecidamente diferentes entre as espécies, e o impacto dessas diferenças na expressão quantitativa e qualitativa de erosão dentária não é conhecida <sup>43</sup>. Todas estas questões, associadas aos intervalos entre as datas dos sacrifícios, talvez muito amplos, podem ter contribuído para o efeito discreto da supressão farmacológica da secreção salivar sobre as erosões dentárias neste modelo.

#### **8.2.5. Conclusões.**

Levando-se em consideração as dificuldades de interpretação e comparação dos resultados de estudos em animais <sup>43</sup>, o efeito erosivo do vinho tinto testado sobre os molares dos camundongos pode ser considerado significativo no modelo proposto; e o efeito da supressão farmacológica da secreção salivar com atropina pode também, apesar de discreto, ser considerado importante também no modelo proposto. Estes achados são avalizados pela excelente confiabilidade das medições utilizadas neste estudo, e pela boa confiabilidade do método proposto, o que dá validade aos achados apresentados.

#### **8.2.6. Agradecimentos.**

Aos funcionários da FEPPS, pela atenção dispensada a nós para que realizássemos o experimento. À Raquel de Oliveira Matos e ao Professor Doutor Emílio Antonio Jeckel-Neto, respectivamente técnica e coordenador do Laboratório de Envelhecimento Celular do IPB-PUCRS, pela pronta disponibilização do laboratório e equipamentos sem os quais não teríamos completado esta tarefa.

### **8.3. MATERIAL DE REFERÊNCIA**

#### **8.3.1. Referência Bibliográfica do Artigo.**

HUGO F. N., AMENÁBAR J. M., PADILHA D. M. P. Erosão dentária em camundongos velhos submetidos ao consumo de vinho.

### **8.3.2. Abstract.**

Among the causative agents for dental erosion is wine and among modifying factors is saliva. The aim of this study was to evaluate the development of dental erosion in aged mice submitted to wine consumption and with an altered salivary flow. In this study 60 mice were distributed in the following groups: Water, Water + Atropine, Wine and Wine + Atropine. Animals in the groups Water + Atropine and Wine + Atropine received an oral dose of atropine sulphate of 45mg/kg per day. The animals were killed at the 15<sup>th</sup>, 30<sup>th</sup> and 45<sup>th</sup> days of the experiment and had their right hemi mandibles removed, stained and photographed under magnification to permit further analysis of the following measurements (areas): Total; Intact; Enamel Erosion; and Dentin Erosion Areas. Reliability of the measurements was excellent. The means of Intact Area within the groups Water and Water + Atropine were always significantly bigger than the mean areas in the groups Wine and Wine + Atropine, while the mean areas of Enamel and Dentin erosion in these groups were always significantly bigger than the mean areas in the groups Water and Water + Atropine. The mean values of Total area were, in general, not significantly different among the groups. Enamel Erosion mean values at 15 days in Wine group were significant smaller than the mean values in the Wine + Atropine group. The erosive effect of the wine tested in this experiment was considered significant as was the effect of pharmacologically suppressed salivary secretion, that despite discrete, was also important.

### **8.3.3. Uniterms.**

Atropine, Mice, Saliva, Tooth erosion, Wine.

### **8.3.4. Referências Bibliográficas.**

1. Imfeld T. Dental erosion. Definition, classification and links. *European Journal of Oral Sciences* 1996; 104: 151-155.
2. Eccles JD, Jenkins WG. Dental erosion and diet. *Journal of Dentistry* 1973; 2: 153-159.
3. ten Cate JM, Imfeld T. Dental erosion, summary. *European Journal of Oral Sciences* 1996; 104: 241-244.
4. Larsen MJ. Demineralization of human enamel. *Scandinavian Journal of Dental Research* 1974; 82: 491-495.
5. West NX, Maxwell A, Hughes JA, Parker DM, Newcombe RG, Addy M. A method to measure clinical erosion: the effect of orange juice consumption on erosion of enamel. *Journal of Dentistry* 1998; 26: 329-335.
6. Lussi A, Jäggi T, Schärer S. The influence of different factors on in vitro enamel erosion. *Caries Research* 1993; 27: 387-393.
7. Maia LC, Modesto A. Análise comparativa, ao microscópio eletrônico de varredura, de esmalte bovino exposto a diferentes soluções ácidas. Um estudo *in vitro*. *Revista de Odontologia da Universidade de São Paulo* 1996; 10: 161-168.
8. Maupomé G, Aguilar-Avila M, Medrano-Ugalde HA, Borges-Yáñez A. In vitro quantitative microhardness assessment of enamel with early salivary pellicles after exposure to an eroding cola drink. *Caries Research* 1999; 33: 140-147.
9. Meurman JH, Sorvari R, Pettari A, Rytöma I, Franssila S, Kroon L. Hospital mouth-cleaning aids may cause dental erosion. *Special Care Dentistry* 1996; 16:247-250.
10. McCracken M, O'Neal SJ. Dental erosion and aspirin headache powders: A clinical report. *Journal of Prosthodontics* 2000; 9: 95-98.

11. Meurman JK, Vesterinen M. Wine, alcohol, oral health, with special emphasis on dental erosion. *Quintessence International* 2000; 31: 729-733.
12. Gray A, Ferguson MM, Wall JG. Wine tasting and dental erosion. Case report. *Australian Dental Journal* 1998; 43: 32-34.
13. Sorvari R, Kiviranta I. A semi quantitative method of recording experimental tooth erosion and estimating occlusal wear in the rat. *Archives of Oral Biology* 1988; 33: 217-220.
14. Järvinen VK, Rytömaa II, Heinonen OP. Risk Factors in Dental erosion. *Journal of Dental Research* 1991; 70: 942-947.
15. Allan DN. Enamel erosion with lemon juice. *British Dental Journal* 1967; 122: 300-302.
16. Gaunt JL. Dental erosion resulting from chewable vitamin C tablets. *Journal of the American Dental Association* 1983; 107: 253-256.
17. Smith BGN, Robb ND. Dental erosion in patients with chronic alcoholism. *Journal of Dentistry* 1989; 17: 219-221.
18. Hede B. Determinants of oral health in a group of Danish alcoholics. *European Journal of Oral Sciences* 1996; 103: 403-408.
19. Ganss C, Schleschriemen, Klimek J. Dental erosion in subjects living on a raw food diet. *Caries Research* 1999; 33: 74-80.
20. Wiktorsson AN, Zimmerman M, Angmar-Månsson B. Erosive tooth wear: prevalence and severity in Swedish wine tasters. *European Journal of Oral Sciences* 1997; 105: 544-550.
21. Linkossalo E, Markkanen H. Dental erosions in relation to lactovegetarian diet. *Scandinavian Journal of Dental Research* 1985; 93: 436-441.

22. Moss SJ. Dental erosion. *International Dental Journal* 1998; 48: 529-539.
23. Meurman JH, Frank RM. Scanning electron microscopic study of the effect of salivary pellicle on enamel erosion. *Caries Research* 1991; 25: 1-6.
24. Hannig M, Baltz M. Influence of *in vivo* formed salivary pellicle on enamel erosion. *Caries Research* 33: 372-379.
25. Mok TB, McIntyre J, Hunt D. In vitro model of wine assessor's erosion. *Australian Dental Journal* 2001; 46: 263-268.
26. Martínez-Gomis J, Planas ME, Planelles X, Bartrons R, Sánchez S. Fluoride and pilocarpine reduce the risk of caries produced by chronic clomipramine treatment in rats. *Caries Research* 1997; 31: 155-160.
27. Watson GE, Pearson SK, Falany JL, Culp DJ, Tabak LA, Bowen WH. The effect of chronic atropine treatment on salivary composition and caries in rats. *Journal of Dental Research* 1989; 68: 1739-1745.
28. Watson GE, Pearson SK, Falany JL, Tabak LA, Bowen WH. The effect of chronic propranolol treatment on salivary composition and caries in the rat. *Archives of Oral Biology* 1990; 35: 435-441.
29. Mistry M, Grenby TH. Erosion by soft drinks of rat molar teeth assessed by digital image analysis. *Caries Research* 1993; 27: 21-25.
30. Sorvari R. Effects of various sport drink on modifications on dental erosion in rats with controlled eating and drinking pattern. *Proceedings of Finnish Dental Society* 1989; 85: 13-20.
31. Sorvari R, Pelttari A, Meurman JH. Surface ultra structure of rat molar teeth after experimentally induced erosion and attrition. *Caries Research* 1996; 30: 163-168.

32. Sorvari R, Kiviranta I. A semi quantitative method of recording experimental tooth erosion and estimating occlusal wear in the rat. *Archives of Oral Biology* 1988; 33: 217-220.
33. Nunn JH. Prevalence of dental erosion and the implications for oral health. *European Journal of Oral Sciences* 1996; 104: 156-161.
34. Moynihan P, Ettinger R, Young WG, Lussi A, Nunn J, Walls AWG. Dietary and nutritional aspects of tooth wear. *Journal of Dental Research* 2002; 81 (Spec Iss A): A-218.
35. Neidle EA, Yagiela JÁ. *Farmacologia e Terapêutica para Dentistas*. 3<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro, Editora Guanabara Koogan, 1991.
36. Council on Dental Therapeutics of the American Dental Association. *Accepted Dental Therapeutics*. 3<sup>a</sup> ed. Chicago, 1982.
37. Goth A. *Medical Pharmacology (Principles and Concepts)*. 3<sup>a</sup> ed. Saint Louis, The CV Mosby Company, 1966: 668p.
38. Altman, DG. *Practical statistics for medical research*. 1<sup>st</sup> ed. London, Chapman and Hall 1991: 611 p.
39. Bland JM, Altman DG. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet*. 1986 Feb 8; 1: 307-10.
40. Grenby TH. Methods of assessing erosion and erosive potential. *European Journal of Oral Sciences* 1996; 104: 207-214.
41. Smith JA, Boyd KM. Ethics and Laboratory Animals: Can the use of Animals in Experiments be Justified: 1-14, in: Tuffery AA. *Laboratory Animals: An Introduction for experimenters*. 2<sup>nd</sup> ed. Chichester, Wiley, 1995: 392p.

42. Seymour R. Dental pharmacology problems for the elderly: 42-50, in: Barnes IE, Walls A. Gerodontology. 1<sup>st</sup> ed. Oxford, Wright, 1994: 212 p.
43. Zero DT. Etiology of dental erosion - extrinsic factors. *European Journal of Oral Sciences* 1996; 104: 162-177.
44. Scully C. The pathology of orofacial disease: 29-41, in: Barnes IE, Walls A. Gerodontology. 1<sup>st</sup> ed. Oxford, Wright, 1994: 212 p.
45. Bardow A, Nyvad B, Nauntofte B. Relationships between medication intake, complaints of dry mouth, salivary flow rate and composition, and the rate of tooth demineralization in situ. *Archives of Oral Biology* 2001; 46: 413-423.

#### **8.3.5. Endereço.**

Fernando Neves Hugo, fnhugo@zipmail.com.Br, fone (51) 3246-9646, fax (51) 3232-3364; José Miguel Amenábar, jamenaba@terra.com.br; Dalva Maria Pereira Padilha, dpadilha@vias.net.

**Tabela 1.** Desenho experimental. Porto Alegre, 2002.

Grupo	Tempo de Exposição			Total
	15° dia	30° dia	45° dia	
Água	5 animais	5 animais	5 animais	15 animais
Água e Atropina	5 animais	5 animais	5 animais	15 animais
Vinho	5 animais	5 animais	5 animais	15 animais
Vinho e Atropina	5 animais	5 animais	5 animais	15 animais
Total	15 animais	15 animais	15 animais	60 animais

**Tabela 2.** Consumo médio de líquido (em ml/dia  $\pm$  desvio padrão), peso médio inicial (em gramas  $\pm$  desvio padrão), peso médio final (em gramas  $\pm$  desvio padrão) e diferença de peso (peso final – peso inicial), (em gramas) dos animais nos diferentes grupos e períodos experimentais. As diferenças significativas são indicadas pelos símbolos. Porto Alegre, 2002.

		Consumo de líquido	Peso Inicial	Peso Final	Diferença de Peso
Grupo Água	15 dias	13,7 ( $\pm$ 5,68) <sup><math>\alpha, \gamma</math></sup>	47,48 ( $\pm$ 1,76)	46,34 ( $\pm$ 1,28)	-1,14 ( $\pm$ 1,71)
	30 dias	13,64 ( $\pm$ 1,55) <sup><math>\beta</math></sup>	44,26 ( $\pm$ 1,15)	44,6 ( $\pm$ 1,73)	0,34 ( $\pm$ 0,84)
	45 dias	13,65 ( $\pm$ 0,59) <sup><math>\delta</math></sup>	46,62 ( $\pm$ 3,50)	47,16 ( $\pm$ 3,89)	0,54 ( $\pm$ 1,37)
Grupo Água e Atropina	15 dias	7,9 ( $\pm$ 0,78)	45,66 ( $\pm$ 4,15)	42,96 ( $\pm$ 2,93) <sup><math>\epsilon</math></sup>	-2,7 ( $\pm$ 1,60)
	30 dias	11,58 ( $\pm$ 1,56)	49,92 ( $\pm$ 8,90)	46,8 ( $\pm$ 9,08)	-3,12 ( $\pm$ 4,82)
	45 dias	10,1 ( $\pm$ 1,39)	45,34 ( $\pm$ 3,72)	43,56 ( $\pm$ 3,14)	-1,78 ( $\pm$ 1,64)
Grupo Vinho	15 dias	10,15 ( $\pm$ 1,51)	44,94 ( $\pm$ 3,47)	42,4 ( $\pm$ 3,44) <sup><math>\zeta</math></sup>	-2,54 ( $\pm$ 1,04)
	30 dias	13,39 ( $\pm$ 1,59)	47,5 ( $\pm$ 6,90)	40,82 ( $\pm$ 7,48) <sup><math>\epsilon</math></sup>	-6,68 ( $\pm$ 4,02)
	45 dias	13,19 ( $\pm$ 0,82) <sup><math>\delta</math></sup>	47,2 ( $\pm$ 5,85)	43,26 ( $\pm$ 5,61) <sup><math>\epsilon</math></sup>	-3,94 ( $\pm$ 2,50)
Grupo Vinho e Atropina	15 dias	13,8 ( $\pm$ 1,36) <sup><math>\gamma</math></sup>	48,14 ( $\pm$ 4,19)	42,54 ( $\pm$ 3,29) <sup><math>\zeta</math></sup>	-5,6 ( $\pm$ 2,47)
	30 dias	14,34 ( $\pm$ 1,95)	48,42 ( $\pm$ 3,77)	39,04 ( $\pm$ 4,30) <sup><math>\zeta</math></sup>	-9,38 ( $\pm$ 2,79)
	45 dias	13,1 ( $\pm$ 0,55) <sup><math>\delta</math></sup>	47,74 ( $\pm$ 4,01)	42,38 ( $\pm$ 3,37) <sup><math>\epsilon</math></sup>	-5,36 ( $\pm$ 2,74)

$\alpha$ . Diferença significativa entre os grupos, teste ANOVA,  $p < 0,05$ .  $\beta$ . Diferença significativa entre os grupos, teste ANOVA,  $p < 0,01$ .  $\gamma$ . Diferença significativa, Grupo Água e Atropina, no respectivo período experimental, teste *post hoc* de Tukey,  $p < 0,05$ .  $\delta$ . Diferença significativa, Grupo Água e Atropina no respectivo período experimental, teste *post hoc* de Tukey,  $p < 0,01$ .  $\epsilon$ . Diferença significativa entre peso inicial e peso final, teste t de Student pareado,  $p < 0,05$ .  $\zeta$ . Diferença significativa entre peso inicial e peso final, teste t de Student pareado,  $p < 0,01$ .

**Tabela 3.** Médias das áreas (em mm<sup>2</sup> ± desvio padrão): Intacta, Erosão em Esmalte, Erosão em Dentina, e Total dos diferentes grupos experimentais. As diferenças significativas são indicadas pelos símbolos. Porto Alegre, 2002.

	Intacta	Esmalte	Dentina	Total
Grupo Água	0,83 (±0,06) <sup>α</sup>	0,00 (±0,00) <sup>α</sup>	0 (0) <sup>α</sup>	0,83 (±0,06) <sup>α</sup>
Grupo Água e Atropina	0,8 (±0,04)	0,00 (±0,00)	0 (0)	0,8 (±0,04)
Grupo Vinho	0,36 (±0,11) <sup>β</sup>	0,18 (±0,09) <sup>β</sup>	0,17 (±0,10) <sup>β</sup>	0,72 (±0,11) <sup>γ, δ</sup>
Grupo Vinho e Atropina	0,35 (±0,06) <sup>β</sup>	0,24 (±0,09) <sup>β</sup>	0,18 (±0,11) <sup>β</sup>	0,78 (±0,09)

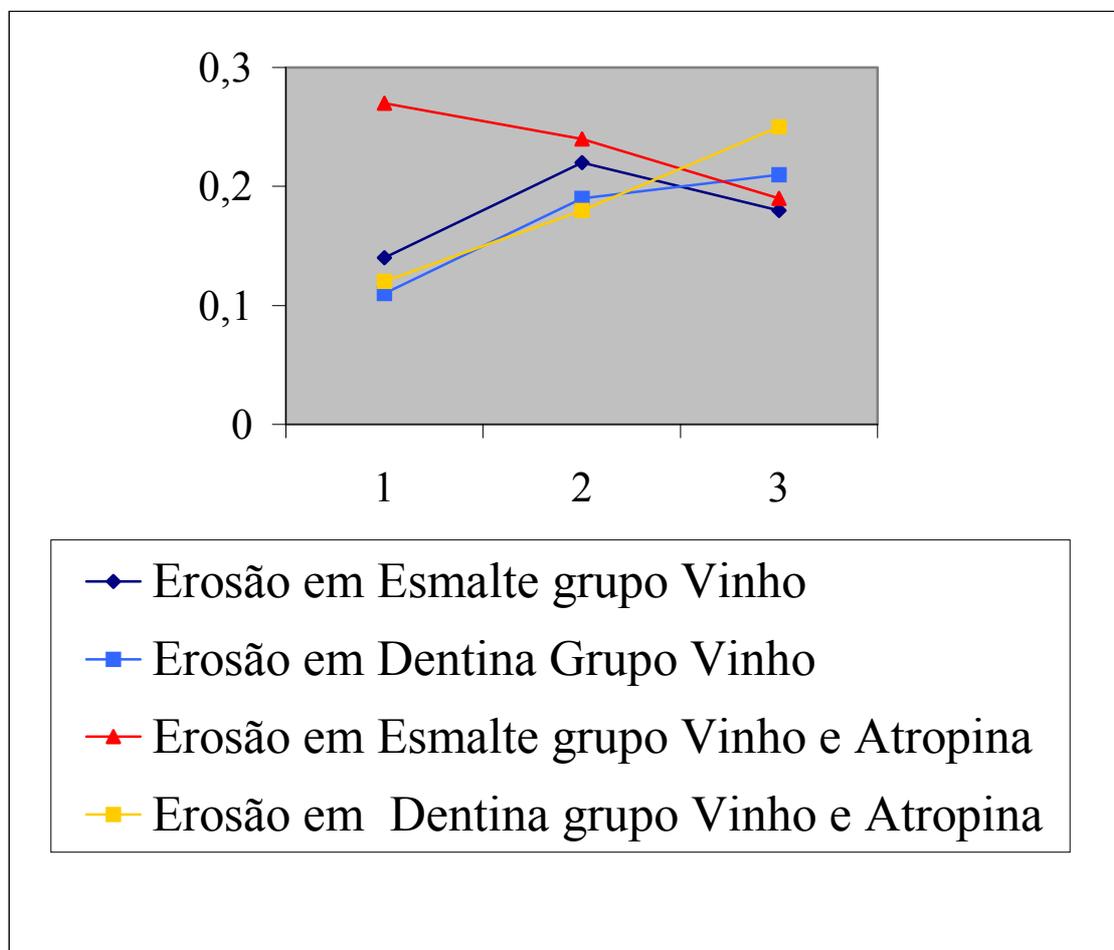
**α.** Diferença significativa entre os grupos, teste ANOVA, p<0,001. **β.** Diferença significativa com os grupos Água e Água e Atropina, teste *post hoc* de Tukey, p<0,001. **γ.** Diferença significativa com o Grupo Água, teste *post hoc* de Tukey, p<0,01. **δ.** Diferença significativa com o Grupo Água e Atropina, teste *post hoc* de Tukey, p<0,05.

**Tabela 4.** Médias das áreas (em mm<sup>2</sup> ± desvio padrão): Intacta, Erosão em Esmalte, Erosão em Dentina, e Total dos diferentes grupos nos diferentes períodos do experimento. As diferenças significativas são indicadas pelos símbolos. Porto Alegre, 2002.

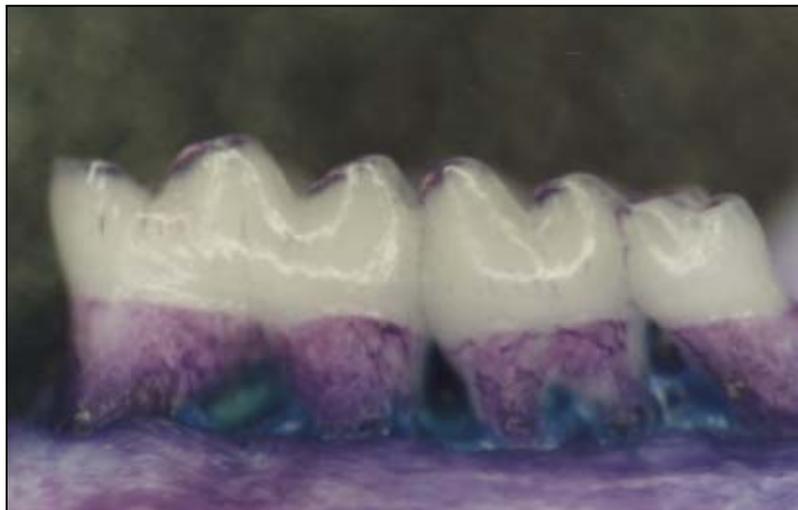
		Intacta	Esmalte	Dentina	Total
Grupo Água	15 dias	0,88 (±0,06) <sup>γ</sup>	0,00 (±0,00) <sup>γ</sup>	0 (0) <sup>β</sup>	0,88 (±0,07) <sup>α</sup>
	30 dias	0,78 (±0,06) <sup>γ</sup>	0,00 (±0,00) <sup>γ</sup>	0 (0) <sup>β</sup>	0,79 (±0,06)
	45 dias	0,83 (±0,03) <sup>γ</sup>	0,00 (±0,00) <sup>γ</sup>	0 (0) <sup>γ</sup>	0,76 (±0,09)
Grupo Água e Atropina	15 dias	0,80 (±0,05)	0,00 (±0,08)	0 (0)	0,80 (±0,05)
	30 dias	0,79 (±0,03)	0,00 (±0,00)	0 (0)	0,80 (±0,04)
	45 dias	0,81 (±0,05)	0 (0)	0 (0)	0,81 (±0,05)
Grupo Vinho	15 dias	0,43 (±0,07) <sup>ζ, ι</sup>	0,14 (±0,07) <sup>η</sup>	0,11 (±0,08) <sup>δ</sup>	0,69 (±0,11) <sup>θ</sup>
	30 dias	0,27 (±0,12) <sup>ζ</sup>	0,22 (±0,12) <sup>ε</sup>	0,19 (±0,10) <sup>δ</sup>	0,69 (±0,10)
	45 dias	0,38 (±0,09) <sup>ζ</sup>	0,18 (±0,08) <sup>ε</sup>	0,21 (±0,11) <sup>ε</sup>	0,81 (±0,05)
Grupo Vinho e Atropina	15 dias	0,37 (±0,05) <sup>ζ</sup>	0,27 (±0,10) <sup>ζ</sup>	0,12 (±0,07) <sup>δ</sup>	0,77 (±0,08)
	30 dias	0,32 (±0,08) <sup>ζ</sup>	0,24 (±0,08) <sup>ε</sup>	0,18 (±0,14) <sup>δ</sup>	0,75 (±0,11)
	45 dias	0,36 (±0,05) <sup>ζ</sup>	0,19 (±0,10) <sup>ε</sup>	0,25 (±0,10) <sup>ε</sup>	0,81 (±0,09)

**α.** Diferença significativa entre os grupos, teste ANOVA, p<0,05. **β.** Diferença significativa entre os grupos, teste ANOVA, p<0,01. **γ.** Diferença significativa entre os grupos, teste ANOVA, p<0,001. **δ.** Diferença significativa, grupos Água, e Água e Atropina, no mesmo período, teste de Tukey, p<0,05. **ε.** Diferença significativa, grupos Água, e Água e Atropina, no mesmo período, teste de Tukey, p<0,01. **ζ.** Diferença significativa, grupos Água, e Água e Atropina, no mesmo período, teste de Tukey, p<0,001. **η.** Diferença significativa, grupos Água, Água e Atropina, e Vinho e Atropina, no mesmo período, teste de Tukey, p<0,05. **θ.** Diferença significativa, grupo Água, no mesmo período, teste de Tukey, p<0,05. **ι.** Diferença significativa entre os valores médios de Área Intacta nos diferentes períodos experimentais, teste de Friedman, p<0,05. Diferença entre os períodos 15 e 30 dias, teste t de Student pareado, p=0,059.

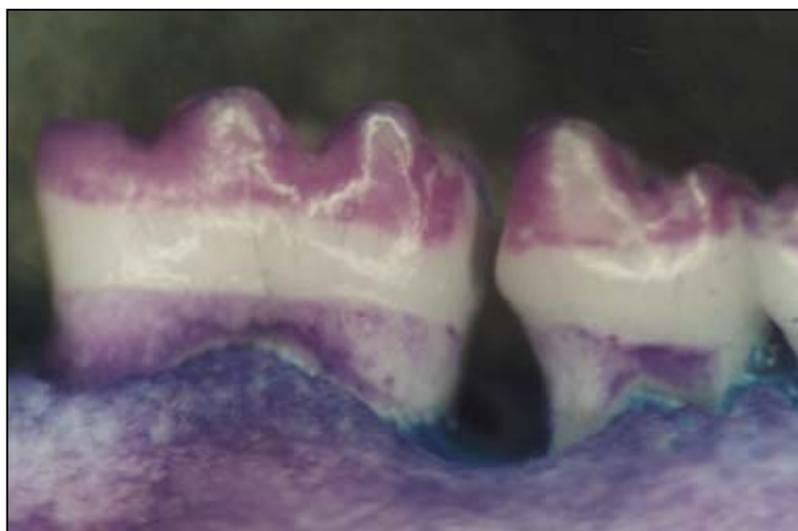
**Gráfico 1.** Progressão das Áreas de Erosão em Esmalte e Dentina nos grupos Vinho e Vinho e Atropina ao longo do período experimental.



**Figura 1.** Fotomicrografia digitalizada do aspecto lingual dos molares mandibulares direitos em um amostra do grupo Água (5 X).



**Figura 2.** Fotomicrografia digitalizada do aspecto lingual dos molares mandibulares direitos em uma amostra do grupo Vinho e Atropina (5 X).



## **9. RESULTADOS PRINCIPAIS**

### **9.1. Artigo 1.**

Não houve diferenças nos aspectos da erosão do esmalte ocorridos, tanto no grupo de blocos previamente imersos em saliva, como nos imersos em água. Em alguns blocos poucos efeitos erosivos foram observados, resultado apenas do alargamento de ranhuras fisiológicas do esmalte. Em blocos onde havia erosão severa, foi possível reconhecer o aspecto de favos de mel dos prismas de esmalte. A imersão dos blocos de esmalte bovino em vinho tinto foi capaz de causar erosão da superfície dos blocos de esmalte bovino, mas não houve diferenças no padrão e severidade de erosão entre os diferentes grupos e, nas condições deste experimento, a imersão prévia em saliva não protegeu a superfície do esmalte.

### **9.2. Artigo 2.**

No grupo controle, a confiabilidade e os limites de concordância intra e interexaminadores foram, de modo geral, próximos a zero, exceto pelos valores interexaminador dos limites de concordância da Área Intacta e da Área Total no primeiro molar, e pelos valores interexaminadores da confiabilidade e dos limites de concordância da Área Total para a soma da Área dos primeiros e segundos molares.

Nos grupo teste, as diferenças médias intraexaminador entre os pares de observações (confiabilidade) também foram baixas, tanto nas medições realizadas nos primeiros como nas realizadas nos segundos molares, para a maioria das variáveis testadas. Porém, os valores dos limites de concordância das Áreas de Erosão Total, Total e Erosão em Esmalte dos primeiros molares e das Áreas de Erosão em Dentina e Total dos segundos molares obtidos pelas medições do examinador 1 foram, considerando-se as extensões avaliadas, importantes.

As diferenças médias das observações interexaminadores para as amostras de primeiros e segundos molares do grupo teste foram próximos de zero para todas

variáveis avaliadas. Há, entretanto, que se observar que os desvios-padrão para estes pares de medições foram mais altos, refletindo sobre a extensão dos valores dos limites de concordância interexaminadores, e nos tamanho e confiabilidade dos resultados nas medições realizadas nos segundos molares e na soma de primeiros e segundos molares.

### 9.3. Artigo 3.

As diferenças entre os valores iniciais e finais do pH dos líquidos nos grupos do experimento não foram significativamente diferentes entre si. Também não houve diferenças significativas entre pesos médios dos animais dos diferentes grupos. Houve diferenças significativas, porém, entre os pesos iniciais e finais para animais de um mesmo grupo e no consumo médios diário de líquidos entre os grupos aos 15, aos 30 e aos 45 dias. Testes *post hoc* de Tukey mostraram diferenças significativas entre o grupo Água e Atropina e os Grupos Água e Vinho e Atropina aos 15 dias; e entre o grupo Água e Atropina e os grupos Água, Vinho e Água e Atropina aos 45 dias.

Quando o tempo não foi considerado para fins de análise estatística e apenas as médias de todos os animais de um grupo foram, houve diferenças significativas entre os grupos Água, Água e Atropina, e Vinho e Vinho e Atropina para todas as variáveis avaliadas.

As médias de Área Intacta, Área de Erosão em Esmalte, e Área de Erosão em Dentina dos diferentes grupos nos diferentes períodos experimentais (15, 30 e 45 dias) foram significativamente diferentes entre si. De modo geral, os valores médios de Área Intacta dos grupos Água e Água e Atropina foram significativamente maiores que os valores dos grupos Vinho e Vinho e Atropina, cujos valores das Áreas de Erosão em Esmalte e Áreas de Erosão em Dentina foram, sempre, significativamente maiores que os valores dos grupos Água e Água e Atropina. Aos 15 dias a Área média de Erosão em Esmalte no grupo Vinho foi significativamente menor que a do grupo Vinho e Atropina.

## 10. NOTAS FINAIS

As três principais abordagens utilizadas na investigação de erosões dentária são: os métodos *in vitro*, como os químicos (medição de pH, cálcio e fósforo em soluções), análise de imagens digitalizadas e microscopia eletrônica de varredura; os modelos experimentais em animais como sistemas de escores categóricos, análise de imagens digitalizadas, e microscopia eletrônica de varredura; e as técnicas para avaliação de erosão no homem <sup>11</sup>. Neste estudo foram utilizadas: uma abordagem *in vitro* (**Artigo 1**) e um modelo *in vivo* em roedores (**Artigo 3**), desenvolvido pelos pesquisadores (**Artigo 2**). Os métodos escolhidos foram microscopia eletrônica de varredura (**Artigo 1**) e análise de imagens digitalizadas (**Artigo 3**).

Associaram-se, com esta escolha, as vantagens e desvantagens do uso das duas diferentes abordagens. Quando microscopia eletrônica de varredura é utilizada como método em experimentos *in vitro* as vantagens são o mimetismo da superfície do dente e a boa reprodutibilidade quando da realização de experimentos quantitativos e qualitativos. A boa reprodutibilidade também é uma das vantagens do uso de análise de imagens digitais em experimentos com animais, que é associada a uma alta acurácia e a superioridade dos dados obtidos, que são quantitativos. Entre as desvantagens dos dois métodos estão o alto custo dos equipamentos e a necessidade de pessoal treinado <sup>11</sup>.

A abordagem utilizada permitiu que alterações micromorfológicas *in vitro* e o desenvolvimento *in vivo* em roedores fosse verificado, constituindo-se assim um sistema sensível (microscopia eletrônica de varredura) na detecção de lesões iniciais, e seguro, sob a perspectiva de quantificação *in vivo*, das erosões dentárias, e conseqüentemente da verificação do potencial erosivo de diversos componentes da dieta.

O papel do vinho como agente causal de erosão pode ser considerado significativo nos modelos propostos, pois tanto no experimento *in vitro* (**Artigo 1**) como no em animais (**Artigo 3**) sua ação como agente desmineralizador foi importante, e compatível com a descrita por outros pesquisadores tanto em experimentos *in vitro* <sup>38, 39</sup>, <sup>52</sup>, como num relato de caso <sup>39</sup> e num estudo de prevalência <sup>9</sup>.

A capacidade da saliva, reconhecida agente modificadora <sup>34</sup>, e seu potencial na proteção contra erosão dentária também foi avaliada. Na investigação *in vitro* (**Artigo 1**), a formação de película salivar não proveu proteção ao esmalte atacado por ácido provavelmente devido ao período de exposição ou mesmo ao tipo de ácido presente no vinho, que pode ter agido de modo significativo sobre a estrutura da película salivar. É reconhecido que em processos de desmineralização o tipo de ácido e sua concentração são mais importantes que o pH sozinho na determinação do potencial de erosão <sup>52</sup>. Quando o papel da saliva foi investigado no modelo *in vivo* (**Artigo 3**), a proteção fornecida pela saliva, mesmo que discreta, pode ser considerada importante. Este achado é corroborado pela confiabilidade da metodologia proposta para a quantificação de erosão dentária (**Artigo 2**), e pela ação supressora da atropina sobre a secreção salivar em roedores <sup>14</sup>.

Todos estes resultados, quando observados em conjunto, permitem que as seguintes considerações sejam feitas:

O papel do vinho tinto como agente erosivo é significativo, nos modelos propostos.

A saliva teve, no estudo experimental *in vivo*, um papel importante, apesar de discreto, como modificadora de erosões dentárias.

A método proposto para quantificação de erosões dentárias é confiável e seu uso, respeitando-se as condições indicadas, é recomendado.

## 11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Allan DN. Enamel erosion with lemon juice. *British Dental Journal* 1967; 122: 300-302.
2. Birkhed D. Sugar content, acidity and effect on plaque pH of fruit juices, fruit drinks, carbonated beverages and sport drinks. *Caries Research* 1984; 18: 120-127.
3. Lussi A, Jäggi T, Schärer S. The influence of different factors on in vitro enamel erosion. *Caries Research* 1993; 27: 387-393.
4. Mistry M, Grenby TH. Erosion by soft drinks of rat molar teeth assessed by digital image analysis. *Caries Research* 1993; 27: 21-25.
5. Rugg-Gunn AJ, Maguire A, Gordon PH, McCabe JF, Stephenson G. Comparison of erosion of dental enamel by four drinks using an intra-oral appliance. *Caries Research* 1998; 32: 337-343.
6. Sorvari R. Effects of various sport drink on modifications on dental erosion in rats with controled eating and drinking pattern. *Proceedings of Finnish Dental Society* 1989; 85: 13-20.
7. Smith BGN, Robb ND. Dental erosion in patients with chronic alcoholism. *Journal of Dentistry* 1989; 17: 219-221.
8. Hede B. Determinants of oral health in a group of Danish alcoholics. *European Journal of Oral Sciences* 1996; 103: 403-408.

9. Wiktorsson AN, Zimmerman M, Angmar-Månsson B. Erosive tooth wear: prevalence and severity in Swedish wine tasters. *European Journal of Oral Sciences* 1997; 105: 544-550.
10. Nogueira FN, Souza DN, Nicolau J. In vitro approach to evaluate harmful effects of beer on teeth. *Journal of Dentistry* 2000; 28: 271-276.
11. Zero DT. Etiology of dental erosion - extrinsic factors. *European Journal of Oral Sciences* 1996; 104: 162-177.
12. Markitziu A, Salomon I, Gedalia I. Tooth wear, solubility and fluoride concentration of molar - tooth surfaces in rats maintained on simultaneous or separate intake of food and fluoridated drinking water. *Archives of Oral Biology* 1985; 30: 167-169.
13. Sorvari R, Pelttari A, Meurman JH. Surface ultra structure of rat molar teeth after experimentally induced erosion and attrition. *Caries Research* 1996; 30: 163-168.
14. Watson GE, Pearson SK, Falany JL, Culp DJ, Tabak LA, Bowen WH. The effect of chronic atropine treatment on salivary composition and caries in rats. *Journal of Dental Research* 1989; 68: 1739-1745.
15. Watson GE, Pearson SK, Falany JL, Tabak LA, Bowen WH. The effect of chronic propranolol treatment on salivary composition and caries in the rat. *Archives of Oral Biology* 1990; 35: 435-441.
16. Järvinen VK, Rytömaa II, Heinonen OP. Risk Factors in Dental erosion. *Journal of Dental Research* 1991; 70: 942-947.
17. Linkossalo E, Markkanen H. Dental erosions in relation to lactovegetarian diet. *Scandinavian Journal of Dental Research* 1985; 93: 436-441.

18. Maupomé G, Aguilar-Avila M, Medrano-Ugalde HA, Borges-Yáñez A. In vitro quantitative microhardness assessment of enamel with early salivary pellicles after exposure to an eroding cola drink. *Caries Research* 1999; 33: 140-147.
19. Hannig M, Baltz M. Influence of *in vivo* formed salivary pellicle on enamel erosion. *Caries Research* 1999; 33: 372-379.
20. Meurman JH, Frank RM. Scanning electron microscopic study of the effect of salivary pellicle on enamel erosion. *Caries Research* 1991; 25: 1-6.
21. Anderson P, Levinkind M, Elliot JC. Scanning microradiographic studies of rates of *in vitro* demineralization in human and bovine dental enamel. *Archives of Oral Biology* 1998; 43: 649-656.
22. Herkströter FM, Witjes M, Ruben J, Arends J. Time dependency of microhardness indentations in human and bovine dentine compared with human enamel. *Caries Research* 1989; 23: 342-344.
23. Lussi A, Schafner M, Hotz P, Suter P. Dental erosion in a population of Swiss adults. *Community Dentistry and Oral Epidemiology* 1991; 19: 286-29.
24. Nunn JH. Prevalence of dental erosion and the implications for oral health. *European Journal of Oral Sciences* 1996; 104: 156-161.
25. Moynihan P, Ettinger R, Young WG, Lussi A, Nunn J, Walls AWG. Dietary and nutritional aspects of tooth wear. *Journal of Dental Research* 2002; 81 (Spec Iss A): A-218.
26. Imfeld T. Dental erosion. Definition, classification and links. *European Journal of Oral Sciences* 1996; 104: 151-155.
27. Eccles JD, Jenkins WG. Dental erosion and diet. *Journal of Dentistry* 1973; 2: 153-159.

28. ten Cate JM, Imfeld T. Dental erosion, summary. *European Journal of Oral Sciences* 1996; 104: 241-244
29. Larsen MJ. Demineralization of human enamel. *Scandinavian Journal of Dental Research* 1974; 82: 491-495.
30. Davis WB, Winter PJ. The effect of abrasion on enamel and dentine and exposure to dietary acid. *British Dental Journal* 1980; 148: 253-256.
31. Millward A, Shaw L, Smith AJ. In vitro techniques for erosive lesion formation and examination in dental enamel. *Journal of Oral Rehabilitation* 1995; 22: 37-42.
32. Meurman JH, Sorvari R, Pettari A, Rytöma I, Franssila S, Kroon L. Hospital mouth-cleaning aids may cause dental erosion. *Special Care Dentistry* 1996; 16:247-250.
33. McCracken M, O'Neal SJ. Dental erosion and aspirin headache powders: A clinical report. *Journal of Prosthodontics* 2000; 9: 95-98.
34. Moss SJ. Dental erosion. *International Dental Journal* 1998; 48: 529-539.
35. Grenby TH. Methods of assessing erosion and erosive potential. *European Journal of Oral Sciences* 1996; 104: 207-214.
36. West NX, Maxwell A, Hughes JA, Parker DM, Newcombe RG, Addy M. A method to measure clinical erosion: the effect of orange juice consumption on erosion of enamel. *Journal of Dentistry* 1998; 26: 329-335.
37. Maia LC, Modesto A. Análise comparativa, ao microscópio eletrônico de varredura, de esmalte bovino exposto a diferentes soluções ácidas. Um estudo *in vitro*. *Revista de Odontologia da Universidade de São Paulo* 1996; 10: 161-168.

38. Meurman JK, Vesterinen M. Wine, alcohol, oral health, with special emphasis on dental erosion. *Quintessence International* 2000; 31: 729-733.
39. Gray A, Ferguson MM, Wall JG. Wine tasting and dental erosion. Case report. *Australian Dental Journal* 1998; 43: 32-34.
40. Restarski JS, Gortner RA, McCay CM. Effect of acid beverages containing fluorides upon the teeth of rats and puppies. *Journal of the American Dental Association* 1945; 32: 668-675.
41. Holloway PJ, Mellanby M, Stewart RJC. Fruit drinks and tooth erosion. *British Dental Journal* 1958; 104: 305-309.
42. McDonald JL, Stookey GK. Laboratory studies concerning the effect of acid containing beverages on enamel dissolution and experimental dental caries. *Journal of Dental Research* 1973; 52: 211-216.
43. Hartles RL, Wagg BJ. Erosive effect of drinking fluids on the molar teeth of the rat. *Archives of Oral Biology* 1962; 7: 307-315.
44. Giunta JL. Dental erosion resulting from chewable vitamin C tablets. *Journal of the American Dental Association* 1983; 107: 253-256.
45. Ganss C, Schleschtriemen, Klimek J. Dental erosion in subjects living on a raw food diet. *Caries Research* 1999; 33: 74-80.
46. Foppa M, Fuchs FD, Duncan BB. Alcohol and atherosclerosis. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia* 2001; 76: 165-176.
47. Belleville J. The French paradox: possible involvement of ethanol in the protective effect against cardiovascular diseases. *Nutrition* 2002; 18:173-177.

48. Martínez-Gomis J, Planas ME, Planelles X, Bartrons R, Sánchez S. Fluoride and pilocarpine reduce the risk of caries produced by chronic clomipramine treatment in rats. *Caries Research* 1997; 31: 155-160.
49. Eisenburger M, Hughes J, West NX, Jandt KD, Addy M. Ultrasonication as a method to study enamel demineralization during acid erosion. *Caries Research* 2000; 34: 289-294.
50. Zhang XZ, Anderson P, Dowker SEP, Elliott JC. Optical Profilometric study of changes in surface Roughness of enamel during *in vitro* demineralization. *Caries Research* 2000; 34: 164-174.
51. Sorvari R, Kiviranta I. A semi quantitative method of recording experimental tooth erosion and estimating occlusal wear in the rat. *Archives of Oral Biology* 1988; 33: 217-220.
52. Mok TB, McIntyre J, Hunt D. In vitro model of wine assessor's erosion. *Australian Dental Journal* 2001; 46: 263-268.