THAYANNE MONTEIRO RAMOS OLIVEIRA

Avaliação *in situ* do potencial da solução de AmF/NaF/$SnCl_2$, associado ou não ao laser de CO_2, em prevenir erosão em esmalte dental bovino

São Paulo

2015

THAYANNE MONTEIRO RAMOS OLIVEIRA

Avaliação *in situ* do potencial da solução de AmF/NaF/$SnCl_2$, associada ou não ao laser de CO_2, em prevenir a erosão em esmalte dental bovino

Versão Corrigida

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obter o título de Doutora pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia.

Área de Concentração: Dentística

Orientador: Profa. Dra. Patricia Moreira de Freitas Costa e Silva

São Paulo

2015

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

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

Oliveira, Thayanne Monteiro Ramos.
Avaliação *in situ* do potencial da solução de AmF/NaF/$SnCl_2$, associada ou não ao laser de CO_2, em prevenir a erosão em esmalte dental bovino / Thayanne Monteiro Ramos Oliveira; orientador Patricia Moreira de Freitas Costa e Silva. -- São Paulo, 2015.
120 p. : fig., tab., graf.; 30 cm.

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

1. Laser. 2. Erosão de dente. 3. Esmalte dentário. 4. Bovinos. 5. Flúor. I. Silva, Patricia Moreira de Freitas Costa e. II. Título.

Ramos Oliveira TM. Avaliação *in situ* do potencial da solução de AmF/NaF/$SnCl_2$, associada ou não ao laser de CO_2, em prevenir a erosão em esmalte dental bovino. Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutora em Odontologia.

Aprovado em: / / 2015.

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a)._____Instituição: _____

Julgamento: _____Assinatura:_____

Prof(a). Dr(a)._____Instituição: _____

Julgamento: _____Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a)._____Instituição: _____

Julgamento: _____Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a)._____Instituição: _____

Julgamento: _____Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a)._____Instituição: _____

Julgamento: _____Assinatura: _____

*À minha querida mãe, **Flavia**, meu porto-seguro, minha fortaleza, fonte inesgotável de amor e carinho. Obrigada por sonhar os meus sonhos e fazer o impossível, sempre possível. Todas as minhas conquistas aconteceram graças ao seu apoio, entusiasmo e alegria de viver. A sua luta incansável pela minha felicidade me incentiva a querer sempre mais, pois a minha vitória é, e sempre será, a sua vitória também. Te amo muito, Mainha!*

*Às minhas irmãs, **Thaysa e Tâmisa,** pelo amor e cumplicidade que nos une, pelos incentivos diários. Somos exemplo de grandes amigas e a prova de nada é maior que o carinho que tenho por vocês e o espaço que vocês ocupam em meu coração. Obrigada por tudo que são para mim!*

A vocês, tão especiais em minha vida, dedico esta conquista.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À **Deus**, luz da minha vida, minha gratidão por tudo que sou e que conquistei e pela força que me deu para chegar até aqui;

Ao meu pai **Gutemberg**, pela presença constante em meu coração. Sei que onde estiver, estará orgulhoso por este momento.

Ao meu marido **George**. Sou abençoada por te ter como meu marido, grande amigo e incentivador. Obrigada pela cumplicidade, paciência e pelas várias tentativas de amenizar os meus momentos de cansaço. Muito obrigada, de coração, por cuidar de mim e por me fazer tão feliz ao seu lado. Amo você!

Às minhas sobrinhas **Ana Beatriz** e **Maria Fernanda**, por brilharem a minha vida e me proporcionarem tantos momentos de alegria, mesmo quando eu estava exausta. Obrigada por me fazer sentir a tia mais amada desse mundo.

Aos meus cunhados **Francisco**, por me querer tão bem e pelas lindas mensagens de força em todos os momentos; e **Fábio**, pelo acolhimento e por toda a animação presente em nossos encontros. Obrigada pelo carinho e pela amizade especial de vocês.

À Profa. Dra. **Patricia Freitas,** pelo privilégio de ter sido sua orientada. Seu amor pela profissão, seu carinho e seus ensinamentos foram grandes incentivadores para o meu ingresso no Doutorado. Obrigada pela confiança, por ter acreditado no meu potencial e pelas inesquecíveis oportunidades que me ofereceu. Espero um dia ser para os meus alunos, o que você foi, e sempre será, para mim.

AGRADECIMENTOS

À querida amiga **Cynthia**, que dividiu comigo desde o início dessa caminhada tantos momentos de alegrias e angústias. Vibramos juntas com cada conquista. Vencemos diversos obstáculos. Levantou-me nos momentos que fraquejei. Seu carinho e sua presença constantes me mostraram o quanto é importante ter sempre por perto uma pessoa como você para chegarmos aonde chegamos. Te agradeço de coração, por tudo que, sem perceber, fez por mim. Você é muito especial.

Às queridíssimas **Anely**, amiga carinhosa, tão prestativa e doce, e **Bruna**, tão autêntica e auto-astral. Guardarei para sempre nossos momentos de descontração e boas risadas. A distância nunca desatará esse lindo laço de amizade que fizemos;

Às voluntárias da minha pesquisa. O empenho e o esforço de vocês foram fundamentais para a realização desse projeto.

À minha ex-aluna de iniciação científica e amiga, **Camilinha**. Obrigada por toda ajuda e disponibilidade desde quando começamos a trabalhar juntas, na sua iniciação científica. Obrigada pela simples companhia em tantos momentos de solidão. Você foi incrível para mim. Desejo muito sucesso para você!

Aos colegas da pós-graduação em Dentística, pela maravilhosa convivência e trocas de experiências, em especial às queridas **Samira**, pela ajuda nas análises de perfilometria, **Sandrinha**, por todos os momentos de companhia e conversas, **Taís Mantilla**, pelo apoio e várias dicas durante a fase *in situ* do estudo, **Paula Acatauassu**, pela imensa ajuda nas análises de ultramicrodureza transversal e **Mayra e Tati**; pelo carinho desde quando cheguei em São Paulo.

Às **famílias Monteiro, Oliveira e Araujo**, pela força e grande torcida;

À **Universidade Federal de Sergipe**, minha gratidão pelos ensinamentos herdados ao longo de minha formação em Odontologia;

À **Universidade de São Paulo**, representada pelo Reitor Prof. Dr. Marco Antônio Zago;

À **Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo – FOUSP**, representada por seu Diretor Prof. Dr. Waldir Antônio Jorge;

Ào **Prof. Dr. Giulio Galvani,** chefe do Departamento de Dentística da FOUSP e à **Profa. Dra. Márcia Martins Marques**, coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Dentística;

A todos os Professores do Departamento de Dentística da FOUSP, em especial à **Profa. Ana Cecília**, sua doçura e seu profissionalismo me motivam e me engrandecem muito. Você é muito especial e será sempre fonte de inspiração. À **Profa. Dra. Adriana Bona**, pelos ensinamentos transmitidos e pelos momentos de incentivo;

Ao **Prof. Peter Rechmann**, pela grande colaboração no desenho experimental desse estudo e por tornar possível a realização das irradiações das amostras com o laser de CO_2 na Universidade de São Francisco, na Califórnia/EUA;

Aos **Funcionários do Departamento de Dentística da FOUSP**, em especial ao David, Selminha e à querida Soninha, pelo carinho e auxílio constante em tudo que precisei;

Ao **Laboratório Especial de Laser em Odontologia (LELO**) pela oportunidade de estágio clínico e valioso aprendizado no mundo do laser, e às suas funcionárias, em especial Lili, por toda assistência;

Ao técnico **Douglas** (Departamento de Biologia Oral), pelo suporte técnico sempre que precisei;

Às **Funcionárias da Secretaria de Pós Graduação** e aos **Funcionários da Biblioteca,** em especial a Vânia, pela cuidadosa normalização desse trabalho;

À Coordenação de Aprimoramento de Pessoal de Nível Superior (**CAPES**) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (**FAPESP** – Processo: 2012/17170-3), pelo auxílio à pesquisa e disponibilização dos recursos financeiros para a viabilização deste estudo.

Concluo agora um capítulo da minha estória. Aprendi com os melhores professores. Ganhei amigas incríveis. Vivi momentos inesquecíveis. Enfrentei a saudade com

forças que jamais imaginei que tivesse. O carinho de cada um de vocês e as maravilhosas lembranças do dia-a-dia USP estarão na minha memória para sempre.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 15
2 REVISÃO DA LITERATURA 19
2.1 Erosão dental 20
2.2 A saliva e a erosão dental 24
2.2 Os compostos fluoretados e a erosão 27
2.3 Laser de CO_2 32
3 PROPOSIÇÃO 39
4 HIPÓTESES NULA 41
5 MATERIAL E MÉTODOS 43
5.1 Aspectos éticos 44
5.2 Locais da pesquisa 44
5.3 Cálculo amostral 45
5.4 Desenho experimental 45
5.5 Obtenção dos dentes e Preparo das amostras 47
5.6 Seleção das amostras 48
5.7 Delimitação da área do estudo 50
5.8 Irradiação com laser de CO_2 51
5.9 Seleção dos voluntários 52
5.10 Avaliação do fluxo salivar estimulado e pH salivar 52
5.11 Preparo dos dispositivos intra-bucais mandibulares 53
5.12 Esterilização das amostras 54
5.13 Posicionamento das amostras nos dispositivos intra-bucais 54
5.14 Procedimentos intra-bucais 55
5.15 Análise perfilométrica 58
5.16 Ensaio de ultramicrodureza transversal 60
5.17 Análise em Microscópio Eletrônico de Varredura 62
5.18 Análise dos Dados 64
6 RESULTADOS 66
7 DISCUSSÃO 75
8 CONCLUSÕES 86

REFERÊNCIAS.....88
APÊNDICE A – Instruções aos voluntários.....111
APÊNDICE B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....113
ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa.....118
ANEXO B – Certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais.....120

"...Olhando o chão sob os meus pés, vejo a vida correr. E, assim, a cada passo que der, tentarei fazer o melhor que puder. Aprendi.... não tanto quanto quis, mas vi que conhecendo o universo ao meu redor, aprendo a me conhecer melhor. E assim escutarei o tempo que me ensinará a tomar a decisão certa a cada momento. E partirei... em busca de meus ideais. Sei que hoje se encontraram meu passado, presente e futuro. Hoje sinto em mim a emoção da despedida. Hoje é um ponto de chegada e, ao mesmo tempo, ponto de partida..."

Fernando Sabino

RESUMO

Ramos-Oliveira TM. Avaliação *in situ* do potencial da solução de AmF/NaF/$SnCl_2$, associada ou não ao laser de CO_2, em prevenir a erosão em esmalte dental bovino [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2015. Versão Corrigida.

Apesar de vários estudos terem demonstrado resultados promissores do uso da solução de AmF/NaF/$SnCl_2$ no controle da erosão do esmalte dental, não existem relatos da sua associação com a irradiação do substrato com o laser de CO_2, de comprimento de onda de 9,6 µm. Desta forma, o presente estudo teve como objetivo avaliar o potencial da solução de AmF/NaF/$SnCl_2$, associada ou não ao laser de CO_2 (4,5 J/cm^2, 20 Hz, 20 µs), em controlar a erosão em esmalte dental bovino. Treze voluntários participaram desse estudo *in situ,* de delineamento cruzado, em 02 fases (04 dias cada), onde 04 tratamentos foram testados utilizando réplicas (n = 13): GC – nenhum tratamento (controle negativo); GF – solução de AmF/NaF/$SnCl_2$ (controle positivo); GL - irradiação com laser de CO_2 (9,6 µm); GLF - laser de CO_2 associado à solução de AmF/NaF/$SnCl_2$. Os voluntários usaram dispositivos intra-bucais removíveis contendo 08 amostras de esmalte bovino. Na primeira fase, 07 voluntários utilizaram dispositivos intra-bucais contendo amostras dos grupos GC e GL, e outros 06 voluntários utilizaram dispositivos contendo amostras dos grupos GF e GLF. Na segunda fase, os voluntários foram cruzados, permitindo que todos os grupos experimentais fossem avaliados no meio bucal dos 13 voluntários da pesquisa. Os dispositivos intra-bucais foram removidos da boca para ciclagem erosiva *ex-situ* em ácido cítrico 0,65%, pH 3,6, durante 4 minutos, 2x/dia, em horários pré-determinados. As amostras foram avaliadas em perfilômetro óptico de não-contato (n = 13) para análise da perda de tecido mineral após o desafio erosivo, e um ensaio de ultramicrodureza transversal (n = 13) foi realizado com o objetivo de determinar a profundidade da área de desmineralização abaixo da superfície do esmalte erodido. A análise morfológica foi realizada utilizando microscopia eletrônica de varredura (MEV) (n = 3). Os dados foram analisados estatisticamente por meio do modelo ANOVA 2 fatores para medidas repetidas, com subsequente comparação entre os diferentes tratamentos (α = 0,05). A ciclagem ácida realizada no presente

estudo provocou perda de esmalte significativamente maior ($p < 0,001$) nos grupos GC ($4,8 \pm 1,4^{A}$ µm) e GL ($4,4 \pm 2,0^{A}$ µm). Não houve diferença estatística entre a perda de superfície nos grupos GF ($1,9 \pm 0,9^{B}$ µm) e GLF ($1,7 \pm 0,9^{B}$ µm). Os resultados de ultramicrodureza transversal mostraram que as amostras tratadas com a solução fluoretada (grupo GF) apresentaram uma zona parcialmente desmineralizada com média de dureza semelhante às amostras do grupo que não recebeu qualquer tipo de tratamento (grupo GC), com ambos os grupos apresentando média de dureza significativamente maior que os grupos que foram irradiados com o laser de CO_2 (GL e GLF) ($p < 0,001$). As micrografias mostraram que as características morfológicas superficiais do esmalte nos grupos irradiados com laser de CO_2 apresentaram-se semelhantes nos grupos GL e GLF, verificando-se a presença de áreas sugestivas de derretimento, resolidificação, microporos e microtrincas, sem evidências de precipitados fluoretados no grupo GFL. Uma camada amorfa pôde ser observada nas superfícies de esmalte tratadas apenas com a solução fluoretada contendo estanho. Pode-se concluir que o uso do enxaguatório bucal fluoretado contendo estanho (500 ppm F^{-}, 800 ppm Sn^{2+}, pH = 4,5) mostrou potencial de prevenção da erosão de esmalte dental. A irradiação do esmalte dental com o laser associado à solução fluoretada mostrou-se eficaz, mas seu efeito não foi sinérgico. O laser de CO_2 (9,6 µm), nos parâmetros utilizados, não foi capaz de prevenir a erosão em esmalte causada por ácido cítrico.

Palavras-chave: Laser. Erosão. Esmalte Dental. Flúor. Perfilometria. Ultramicrodureza Transversal. In situ.

ABSTRACT

Ramos-Oliveira TM. *In situ* assessment of the potential of AmF/NaF/$SnCl_2$ solution, associated or not to CO_2 laser irradiation, on preventing dental enamel erosion [thesis]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2015. Corrected version.

Although several studies have shown promising results using the AmF/NaF/$SnCl_2$ solution in preventing the erosion of dental enamel, there are no reports of their association with the irradiation of the substrate with the CO_2 laser, working at 9.6 µm. Thus, this study aimed to evaluate the potential of AmF/NaF/$SnCl_2$ solution, associated or not to CO_2 laser irradiation (4.5 J/cm^2, 20 Hz, 20 µs), to prevent erosion on dental enamel. Thirteen volunteers participated in this 2-phase (4 days each), crossover study, where 04 treatments were tested using replicas (n = 13): GC - no treatment (negative control); GF - AmF/NaF/$SnCl_2$ solution (positive control); GL - CO_2 laser irradiation (9.6 µm); GLF - CO_2 laser irradiation associated with AmF/NaF/$SnCl_2$ solution. The volunteers wore removable intra-buccal appliances containing eight bovine enamel samples. In the first phase, seven volunteers used intra-oral appliances containing samples of groups GC and GL and 6 volunteers, appliances containing samples of groups GF and GLF. In the second phase volunteers were crossed over, allowing all experimental groups were evaluated in the buccal environment of the 13 volunteers. Intra-buccal appliances were removed from the mouth and were exposed to a daily ex-situ erosive cycling (0.65% citric acid, pH 3.6, for 4 minutes, 2x/day) at pre-determined times. Samples were evaluated for surface loss using an optical non-contact profilometer (n = 13) for analysis of loss of mineral after the erosive challenge and a cross-sectional nanohardness test (n = 13) was carried out in order to determine the depth of demineralized area below the erosive lesion. Morphological analysis was carried out using scanning electron microscopy (SEM) (n = 3). The data were statistically analyzed by two-way ANOVA repeated measures with subsequent pairwise comparison test (α = 0.05). Erosive challenge significantly increased enamel wear ($p < 0.001$) in GC (4.8 ± 1.4^{A} µm) and GL (4.4 ± 2.0^{A} µm) groups. There was no significant difference between the surface loss in GF (1.9 ± 0.9^{B} µm) and GLF (1.7 ±

0.9[B] µm) groups. Data from cross-sectional nanohardness showed that samples treated with stannous fluoride solution (GF group) showed a partially demineralized zone with average hardness similar to samples in the group that did not receive any treatment (GC group), both groups had significantly higher average nanohardness than the irradiated samples (GL and GLF group) ($p < 0.001$). Morphologically, all CO_2 laser irradiated samples resulted in similar changes, showing the presence of areas suggestive of melting, resolidification and some microcracks. No fluoride precipitates were observed in GFL groups. An amorphous layer could be observed on the surface of enamel treated with tin-containing solution alone. Within the limits of this *in situ* study, it can be concluded that the AmF/NaF/$SnCl_2$ solution (500 ppm F, 800 ppm Sn^{2+}, pH = 4.5) showed potential for prevention of dental enamel erosion. The enamel irradiation with the CO_2 laser associated with the fluoride solution was effective, but its effect was not synergistic. The CO_2 laser (9.6 µm), with the parameters considered in this study, was not able to prevent the enamel erosion caused by citric acid.

Key-words: Laser. Erosion. Dental Enamel. Fluoride. Perfilometry. Cross-sectional Nanohardness. In situ.

Introdução

1 INTRODUÇÃO

A disponibilidade dos fluoretos, a melhor conscientização do paciente pela saúde bucal bem como os avanços nos tratamentos odontológicos contribuíram para um nítido declínio no índice da doença cárie (Nascimento et al., 2013), conforme os resultados dos levantamentos epidemiológicos das condições de saúde bucal da população brasileira, realizado pelo Ministério da Saúde nos anos de 2003 e 2010.

Apesar de a condição da saúde bucal do brasileiro ter melhorado de 2003 aos dias atuais, o aumento da longevidade da população e a consequente manutenção dos dentes na cavidade bucal por mais tempo elevaram significativamente a prevalência e a severidade do desgaste dental nos indivíduos. Associado a esses fatores, o estilo de vida da população passou por mudanças consideráveis. O crescente consumo de alimentos ácidos e potencialmente erosivos e o frequente relato de transtornos alimentares e gastroesofágicos transformaram a erosão dental em uma desordem de grande preocupação para os cirurgiões-dentistas clínicos e pesquisadores.

A maioria dos estudos epidemiológicos revela alta prevalência (entre 26 e 78%) de erosão dentária entre crianças e adolescentes ao redor do mundo (Nunn, 1996; El Aidi et al., 2010; Mantonanaki et al., 2013; Zebrauskas et al., 2014; Kitasako et al., 2015; Salas et al., 2015). No Brasil, a erosão dentária acomete 51,6% dos pré-escolares de 03 e 04 anos de idade (Murakami et al., 2011), 13 a 19,9% dos escolares de 06 a 12 anos de idade (Peres et al., 2005), (Mangueira et al., 2009) e 7,2% dos adolescentes de 12 a 14 anos de idade (Vargas-Ferreira et al., 2011). Estudos epidemiológicos com abordagem de erosão dental em adultos ainda são escassos no Brasil, mas segundo Jaeggi e Lussi (2014), 4-100% dos adultos de 18-88 anos ao redor do mundo revelam algum sinal clínico de erosão dentária.

O principal cuidado com a saúde bucal é a prevenção. Prevenção e/ou controle da erosão dental é sinônimo de mudanças de hábitos alimentares e de higiene dental, estimulação salivar e otimização dos regimes de utilização do flúor. Assim como para a lesão de cárie, o uso de fluoretos ainda é o principal método utilizado na prevenção da erosão dental. No entanto, a sua eficácia ainda é objeto de controvérsias (Ganss et al., 2000; Ganss et al., 2001; Yu et al., 2010a), pois

pouco se sabe sobre o modo de ação dos fluoretos na prevenção e controle da erosão dental, visto que um desafio erosivo é muito mais agressivo do que um desafio cariogênico e somente uma fina camada superficial, parcialmente desmineralizada, permanece para fornecer estrutura para remineralização de uma superfície erodida (Ganss et al., 2001).

Embora a aplicação de agentes fluoretados seja uma das medidas preventivas mais comuns, que visa modular o processo de desmineralização e remineralização (Fowler et al., 2009; Schlueter et al., 2010; Wiegand et al., 2010b), sua ação na redução da perda mineral diante de desafios erosivos é limitada (Ganss et al., 2001; Larsen, 2001; Larsen; Richards, 2002; van Rijkom et al., 2003; Lussi et al., 2008; Yu et al., 2010a). Autores reportam que a camada de precipitados de mineral tipo CaF_2 formada na superfície do dente após a aplicação de fluoretos seja rapidamente dissolvida quando o pH do meio diminui diante da exposição a bebidas ácidas, mesmo na presença de altas concentrações de flúor (Larsen, 2001; Larsen; Richards, 2002; Ganss et al., 2007b).

Entre as recentes propostas de tratamento da superfície do esmalte dental com vistas ao aumento da sua resistência ácida, diferentes tipos de lasers de alta potência, como laser de CO_2, Nd:YAG e argônio, com diferentes modos de operação e parâmetros de irradiação, têm sido propostos para prevenir a perda mineral desse substrato (Rodrigues et al., 2006; Vlacic et al., 2007; Chen; Huang, 2009; Sobral et al., 2009).

Estudos têm mostrado que a irradiação com laser de CO_2, associada ou não a produtos fluoretados, pode ser um método alternativo para inibição da desmineralização ácida, protegendo o esmalte dental contra desafios ácidos erosivos e/ou favorecendo a adsorção de flúor pelo esmalte (Steiner-Oliveira et al., 2006; Wiegand et al., 2010b; Esteves-Oliveira et al., 2011; Esteves-Oliveira et al., 2012; Ramalho et al., 2013). O laser de CO_2 aumentaria a temperatura no esmalte irradiado, induzindo alterações químicas capazes de promover uma superfície do substrato mais ácido-resistente (Featherstone; Nelson, 1987; Klein et al., 2005). Os resultados são promissores, mas ainda inconclusivos em virtude da variedade de metodologias e parâmetros de irradiação utilizados, além de todos estes estudos terem sido realizados *in vitro* e com laser de CO_2 com comprimento de onda de 10,6 µm.

Outros estudos mostram que a absorção do laser pelos grupos fosfato e carbonato do dente nos comprimentos de onda de 9,3 e 9,6 µm é muito mais eficiente, chegando a ser até dez vezes mais absorvido do que os comprimentos de onda de 10,3 e 10,6 µm, o que resulta na deposição de energia mais efetiva no esmalte superficial com menor propagação de calor (2 µm) para o interior do tecido dental (Nelson et al., 1987; Featherstone; Nelson, 1987; Zuerlein et al., 1999; Fried et al., 2002; Rechmann et al., 2011; Rechmann et al., 2013).

Considerando a eficácia limitada do flúor em prevenir ou reduzir a progressão da erosão em esmalte e os efeitos positivos do laser de CO_2 (9,6 µm) de pulsos super curtos na prevenção de lesões de cárie, além da ausência de estudos *in situ* com abordagem desse laser na erosão de esmalte dental, o objetivo deste estudo foi avaliar o potencial da solução de AmF/NaF/$SnCl_2$, associada ou não ao laser de CO_2, com comprimento de onda de 9,6 µm, em proteger o esmalte dental diante de desafios erosivos.

Revisão da Literatura

2 REVISÃO DA LITERATURA

Para melhor compreensão do assunto, a revisão da literatura será abordada em tópicos.

2.1 Erosão Dental

Definida como perda patológica, crônica e localizada do tecido duro dental, a erosão dental é um processo de dissolução química decorrente da exposição a substâncias quelantes e a uma variedade de ácidos de origem não-bacteriana, provenientes da dieta, de medicações, de fontes intrínsecas e até ocupacionais (Imfeld, 1996; Lussi et al., 2011).

Os ácidos intrínsecos são aqueles oriundos do estômago (ácido clorídrico), derivados de vômitos crônicos ou regurgitações frequentes, decorrentes de desordens alimentares (anorexia e/ou bulimia) ou da doença do refluxo gastroesofágico (Ali et al., 2002; Hermont et al., 2014). Também pode estar associada a fatores extrínsecos, os quais estão diretamente relacionados a uma dieta ácida (Zero, 1996).

Atualmente, os ácidos extrínsecos têm sido considerados os principais fatores relacionados ao desenvolvimento clínico da erosão dentária em função da mudança dos hábitos dietéticos da população, que tem consumido com maior frequência refrigerantes, vinhos, bebidas esportivas, sucos naturais e/ou industrializados e frutas cítricas (Scheutzel, 1996; Zero, 1996; Lussi et al., 2008; Magalhães et al., 2009). Cavadini et al. (2000) já haviam reportado um aumento de 300% no consumo de bebidas ácidas nos EUA em um período de 20 anos.

Fatores ligados ao meio-ambiente (exposição ocupacional aos aerossóis ácidos em ambientes de trabalho e à água de piscina incorretamente tratada com baixo pH), a medicações (uso crônico de vitamina C efervescente - ácido ascórbico - e aspirina mastigável - ácido acetilsalicílico) e fatores ligados ao estilo de vida (tipo de alimento, frequência e tempo de consumo, práticas de higiene oral) também

contribuem, em menor frequência, para a ocorrência desse tipo de lesão (Imfeld, 1996; Zero, 1996; Lussi et al., 2011; Kitasako et al., 2015).

Trabalhos epidemiológicos apontam um aumento considerável na prevalência e severidade da erosão dental em diferentes populações e faixas etárias (Nunn et al., 2003; Murakami et al., 2011; Bartlett et al., 2013; Jaeggi; Lussi, 2014).

Há poucos anos, Murakami et al. (2011) realizaram um estudo clínico para avaliar a prevalência e os indicadores de risco para o desgaste erosivo de 967 crianças brasileiras com idade entre 3 e 4 anos. Os autores constataram uma alta prevalência (51,6%) de casos de erosão nas crianças pré-escolares examinadas, sendo os indicadores de risco: o consumo frequente de refrigerantes, o relato de refluxo gastresofágico e a idade da criança.

Uma recente revisão de estudos epidemiológicos revelou uma prevalência de erosão dental em 14% das crianças escolares de 5-9 anos de idade. No grupo de adolescentes de 9-20 anos, 7-100% dos examinados apresentaram erosão. Em adultos de 18-88 anos, a prevalência variou de 4-100% (Jaeggi; Lussi, 2014). No geral, os dados de prevalência não são homogêneos, em virtude da variedade de índices de avaliação existentes, da população estudada e da variedade de examinadores, o que torna a comparação entre estudos epidemiológicos bastante difícil (El Aidi et al., 2010; Jaeggi; Lussi, 2014). Dados de incidência (o aumento do número de sujeitos que apresentam sinais de erosão) são escassos, mas o valor médio anual é de 3,5-18% (Jaeggi; Lussi, 2014).

A patogenia da erosão se baseia na dissociação da hidroxiapatita carbonatada do dente (Featherstone; Lussi, 2006). No esmalte dental, o processo de erosão se inicia com a dissolução parcial da superfície resultando na diminuição de sua dureza (amolecimento superficial) (Lussi et al., 1993; Lussi; Schaffner, 2000; Turssi et al., 2010) e no aumento da rugosidade superficial (Nekrashevych, Stosser, 2003), tornando a superfície do esmalte mais susceptível à ação de forças mecânicas, como abrasão por escovação (Jaeggi; Lussi, 1999; Eisenburger et al., 2003; Rios et al., 2006b). Desafios erosivos frequentes e prolongados podem expor a dentina, levar à perda irreversível de tecido duro dental e resultar em problemas estéticos e/ou funcionais (Lussi et al., 2011; Schlueter et al., 2011a).

Quimicamente, a erosão pode ocorrer através dos íons hidrogênio (H^+) derivados dos ácidos, ou através de ânions, derivados de agentes quelantes, que se ligam ao cálcio tanto da saliva como do esmalte dental (Featherstone; Lussi, 2006).

Após atravessar a barreira da película adquirida salivar, a solução ácida alcança a superfície do esmalte e interage com a fase mineral do dente. Os íons hidrogênio (H^+) (derivados dos ácidos), atacam os cristais do esmalte, difundindo-se pelas áreas de esmalte interprismático e combinando-se diretamente com os íons do dente (carbonato e fosfato), levando à liberação desses ions da superfície do dente e, consequentemente, à dissolução do conteúdo mineral do dente (Featherstone; Rodgers, 1981; Featherstone; Lussi, 2006; Lussi et al., 2011).

Com sua etiologia complexa e multifatorial, a severidade e a manifestação clínica da erosão dental dependem da interação de fatores químicos, biológicos e comportamentais, que podem favorecer ou inibir o processo erosivo (Lussi, 2006; Lussi et al., 2011; Wang; Lussi, 2012; Lussi et al., 2015). A Figura 2.1 mostra os diferentes fatores que interferem na formação das lesões de erosão dental. Fluxo salivar, pH, película adquirida salivar, capacidade tampão, concentração de cálcio e fosfato da saliva, assim como propriedades físicas e químicas do tecido dental, são exemplos de fatores capazes de modificar o processo erosivo (Scheutzel, 1996; ten Cate, Imfeld 1996; Zero, 1996; Hall et al., 1999; Lussi et al., 2004b; Wang; Lussi, 2010; Lussi et al., 2011).

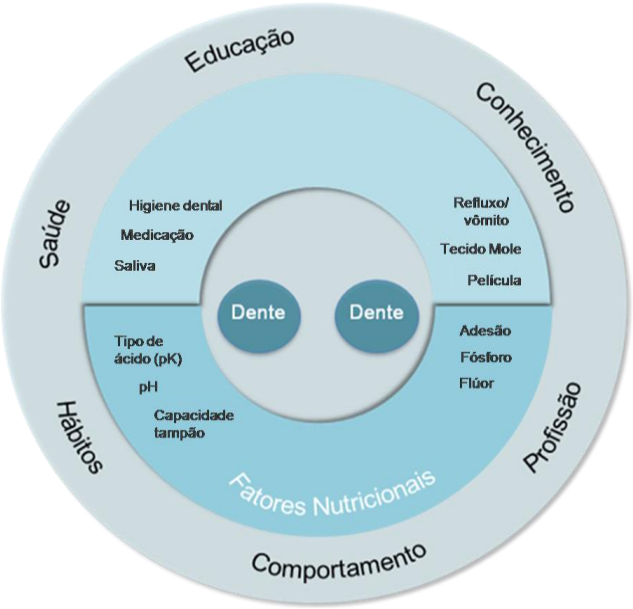

Figura 2.1 – Ilustração traduzida e adaptada do diagrama de Lussi que representa a interação de diferentes fatores capazes de influenciar o desenvolvimento da erosão dental (Lussi et al., 2011, p.4)

Fatores químicos estão comumente relacionados à fonte do ácido. São exemplos de fatores que podem determinar o potencial erosivo de bebidas e alimentos ácidos: tipo e quantidade de ácido, pH da solução (quanto menor o pH, mais ácida é a solução), capacidade tampão (quanto maior a capacidade tampão da solução, mais tempo a saliva demora para neutralizar o meio), conteúdo mineral (a concentração de fosfato, cálcio e flúor determinam o grau de saturação da solução ácida em relação à apatita do esmalte; que é a força motriz para a dissolução) (Wang; Lussi, 2012) e presença de agentes quelantes.

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

Os fatores comportamentais - considerados como fatores modificadores - são aqueles relacionados ao estilo de vida do indivíduo e são os que mais influenciam no desenvolvimento clínico da erosão dental (Zero; Lussi 2006). A forma como o líquido é ingerido, o tempo de contato dos alimentos com o dente, a freqüência de ingestão, o alcoolismo crônico, as desordens alimentares (Bartlett; Shah, 2006), os hábitos de higiene exagerados, o consumo excessivo de algumas medicações, como vitamina C ou aspirina (Lussi, 2006; Lussi; Jaeggi 2008; Magalhaes et al., 2009) são exemplos de fatores que podem exacerbar o desenvolvimento dessas lesões (Levitch et al., 1994; Zero, 1996; Lussi, 2006; Lussi; Jaeggi, 2008).

Os fatores biológicos estão relacionados com as características do próprio indivíduo. Dentre eles, pode-se citar a composição e estrutura dentais, a anatomia dental e oclusão, o posicionamento dos dentes e sua relação com os tecidos moles e língua e, em especial, a saliva e película adquirida (Levitch et al., 1994; Zero, 1996; Gregg et al., 2004; Hara et al., 2006b; Lussi, 2006; Lussi; Jaeggi, 2008). A interação destes fatores justifica a predisposição de alguns indivíduos para o desenvolvimento da lesão de erosão dental, mesmo que todos sejam expostos ao mesmo desafio ácido (Lussi, 2006; Lussi; Jaeggi, 2008).

Considerando os aspectos clínicos da lesão de erosão dental, embora esteja muitas vezes associada a outros tipos de lesões não cariosas, como atrição e abrasão, ela apresenta algumas características peculiares de localização, aparência

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

Inicialmente, as lesões de erosão têm uma superfície amolecida (Amaechi; Higham, 2001a; Voronets; Lussi, 2010); Lussi et al., 2011), com aparência levemente opaca (Ganss; Lussi, 2006). Não havendo qualquer tipo de intervenção, o desgaste erosivo avança e as áreas convexas dos dentes tornam-se planas, podendo ocorrer concavidades com largura maior que a profundidade (Lussi, 1996; Ganss; Lussi, 2006). Nas faces vestibulares, as lesões são caracterizadas por bordo gengival intacto (Lussi et al., 2004b). Esse fenômeno acontece provavelmente devido à ação neutralizante do fluido sulcular, que possui pH neutro, ou à presença de biofilme, que atua como uma barreira de proteção na margem gengival (Featherstone; Lussi, 2006; Ganss; Lussi, 2006). Nas superfícies oclusais dos dentes, é comum o arredondamento de cúspides, com concavidades profundas, exposição dentinária e eventual perda da morfologia oclusal (Ganss; Lussi, 2006; Magalhaes et al., 2009).

2.2 A saliva e a erosão dental

A saliva tem sido considerada o fator biológico mais importante no processo de erosão dental (Hara et al., 2006b; Buzalaf et al., 2012; Wang; Lussi, 2012). Suas propriedades protetoras de tamponar e neutralizar ácidos, diluir substâncias ácidas do ambiente bucal e, principalmente, formar a película adquirida salivar sobre os tecidos duros e moles da cavidade bucal, influenciam consideravelmente no desenvolvimento, ou não, da erosão (Hall et al., 1999; Hannig; Balz, 1999; Lendenmann et al., 2000; Hannig et al., 2004; Hara et al., 2006b; Hellwig et al., 2013).

A saliva é composta por elementos orgânicos, como proteínas e glicoproteínas e, elementos inorgânicos, como sais de bicarbonato, cálcio e fosfato (Buzalaf et al., 2012). As proteínas ricas em prolina (PRP’s) se destacam, juntamente com as estaterinas, por terem a habilidade de aderir-se fortemente ao substrato dentário, principalmente por possuírem grupos fosfato que interagem com

os sais de fosfato de cálcio do esmalte dental. A habilidade dessas proteínas em se ligar ao cálcio do dente e manter elevada a concentração de cálcio próxima ao dente contribui para a redução da desmineralização *in vitro* e, possivelmente, para a remineralização do esmalte (Lendenmann et al., 2000). As PRP's, assim como as histatinas, estão envolvidas no início na formação da película adquirida salivar e são consideradas proteínas precursoras. Por possuírem alta afinidade pela hidroxiapatita do esmalte, elas são rapidamente adsorvidas na superfície dental por forças eletrostáticas (Hannig et al., 2005b). As mucinas também estão presentes na saliva. Elas são glicoproteínas excretadas principalmente pelas glândulas submandibular e sublingual, responsáveis pela função de lubrificação e hidratação do tecido dental (Buzalaf et al., 2012).

Dentre os componentes inorgânicos, o bicarbonato desempenha um importante papel na capacidade tampão da saliva. Além disso, por conter íons cálcio e fosfato em sua composição, a saliva consegue manter um estado de supersaturação em relação ao mineral do dente, os quais podem agir como repositores de minerais perdidos durante desafios ácidos, necessários para a remineralização da estrutura dental (Zero; Lussi, 2005; Hara et al., 2006b). Além disso, o flúor derivado da saliva e/ou dentifrícios contribui para formações de complexos ácido-resistentes, que podem favorecer a remineralização de superfícies desmineralizadas (Meyer-Lueckel et al., 2004).

Os componentes intrínsecos da saliva desempenham um importante papel no desenvolvimento ou não da erosão dental (Hellwig et al., 2013). Por isso, a avaliação da função das glândulas salivares é de grande importância na abordagem da erosão devido à forte associação entre baixo fluxo salivar e/ou baixa capacidade tampão e a susceptibilidade do paciente à erosão dental (Lussi; Schaffner, 2000; Zero; Lussi, 2005). Níveis adequados desses íons contribuem para reduzir a taxa de dissolução do mineral do dente (Meurman; ten Cate, 1996).

Segundo Rios et al. (2006b), o aumento do fluxo salivar através da estimulação salivar com gomas de mascar, por exemplo, pode potencializar a função remineralizadora da saliva, pois a maior concentração do tampão bicarbonato e de minerais da saliva estimulada seria responsável pelo aumento de sua capacidade tampão e precipitação de íons cálcio e fosfato sobre a superfície do tecido dental, favorecendo a propriedade de neutralização dos ácidos e de redução da perda por desmineralização (Amaechi; Higham, 2005).

A película adquirida salivar é uma membrana de proteção, acelular, à base de proteínas e livre de bactérias que pode agir como uma barreira de difusão ou como uma membrana de permeabilidade seletiva (Amaechi et al., 1999c; Hannig; Balz, 1999; Lendenmann et al., 2000; Hannig et al., 2003; Hannig et al., 2005b; Buzalaf et al., 2012; Siqueira et al., 2012). Diversos estudos *in vitro* (Hall et al., 1999; Amaechi; Higham, 2001b; Nekrashevych; Stosser, 2003; Wetton et al., 2006) e *in situ* (Amaechi et al., 1999c; Hannig; Balz, 1999, 2001; Hannig et al., 2003, 2004; Hara et al., 2006a) já mostraram que sua presença previne o contato direto do ácido com a superfície dental e, além de proteger a superfície do esmalte contra certo grau de desmineralização, controla a precipitação de minerais sobre a superfície do dente (Zahradnik, 1979; Amaechi et al., 1999c; Hannig; Balz, 1999).

Para Buzalaf et al. (2012), a presença de proteínas cobrindo a superfície do tecido dental e envolvidas na lubrificação, capacidade tampão e processo de remineralização torna a película adquirida salivar um fator importante relacionado à etiologia da erosão dental. Mais de 100 proteínas já foram identificadas na película do esmalte (Siqueira et al., 2012) e sua presença e quantidade podem afetar a função da película, aumentando ou diminuindo a susceptibilidade do dente à erosão (Hannig; Balz, 1999).

Diferenças na espessura da película adquirida salivar também interferem no grau de proteção contra a desmineralização do esmalte dental. Estudos revelaram que películas salivares delgadas sobre a superfície do dente apresentam uma menor resistência à desmineralização quando comparadas com películas espessas (Amaechi et al., 1999c; Hannig; Balz, 1999; Young; Khan, 2002).

Dentro desse contexto, Hall et al. (1999) enfatizaram a importância de modelos experimentais *in situ*, uma vez que a duplicação dos eventos que podem ocorrer na cavidade bucal é difícil de ser reproduzido em laboratório. Enquanto estudos *in vitro* podem superestimar o grau de perda mineral que ocorre no processo de erosão, os modelos *in situ* permitem o contato das amostras com o ambiente bucal durante a fase experimental, sendo influenciadas por importantes fatores biológicos (West et al., 2000), citados anteriormente.

2.3 Os Compostos Fluoretados e a Erosão

Para melhor entendimento da efetividade das medidas preventivas atualmente aplicadas para erosão dental, é importante revisar o processo químico associado a estas lesões.

Os tecidos duros dentais são compostos principalmente por cristais de hidroxiapatita ($Ca_{10-x}Na_x(PO_4)_{6-y}(CO_3)_z(OH)_{2-u}F_u$), bastante semelhantes à hidroxiapatita mineral [$Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$], cujos íons cálcio podem ser substituídos por íons sódio, magnésio, potássio, cobre, cloro, ferro, manganês, e alguns íons fosfato podem ser substituídos por carbonato (Featherstone; Lussi, 2006). Estas substituições além de tornarem a apatita biológica (do esmalte dental) uma forma mais impura do mineral, desorganizam a matriz cristalina do esmalte, tornando-a mais susceptível à dissolução ácida (Featherstone; Lussi, 2006). O carbonato é considerado a impureza que mais confere solubilidade ao esmalte e representa 3% do peso seco do esmalte (Featherstone, 1999).

Os grupos hidroxila (OH-) quando são substituídos por íons flúor (F^-), leva à formação de fluorapatita [$Ca_{10}(PO_4)_6F_2$], que, por apresentar maior estabilidade cristalina, reduz a susceptibilidade do esmalte à dissolução ácida, quando comparado com a hidroxiapatita mineral (Featherstone; Lussi, 2006). A incorporação dos íons flúor no mineral do dente promove também aumento no tamanho e da espessura dos cristais de hidroxiapatita e diminuição da deficiência de cálcio, ou seja, em virtude dessas substituições, a apatita do esmalte dental se torna muito mais solúvel do que fluorapatita (Featherstone; Lussi, 2006). Portanto, aumentar a resistência ácida dos tecidos duros dentais, através do uso de produtos fluoretados, pode ser considerada uma estratégia eficaz para a prevenção da erosão.

A saliva e o flúor são os fatores mais importantes para remineralização do esmalte amolecido (Buzalaf et al., 2012). Apesar de, até o momento, não haver uma medida padrão e eficaz para tratar e prevenir completamente a erosão dental, o uso de produtos fluoretados ainda é o mais comum.

Sabe-se que fluoretos convencionais, como o fluoreto de sódio (NaF), fluoreto de amina (AmF) e flúor fosfato acidulado (FFA), presentes na maioria dos produtos brasileiros de higiene bucal, apresentam forte potencial em reduzir a desmineralização por cárie, em virtude da formação de uma camada de precipitados

semelhantes ao fluoreto de cálcio (CaF_2) na superfície do esmalte (Bruun; Givskov, 1991). Essa camada protetora atua como uma barreira física que não só impede o contato do ácido com o esmalte subjacente, como também serve de reservatório de íons flúor (Bruun; Givskov, 1991; Ganss et al., 2001; Schlueter et al., 2007). Durante desafios ácidos erosivos, o baixo pH do meio favorece a liberação de íons flúor e cálcio do esmalte, aumentando a saturação de minerais em relação à apatita do esmalte e induzindo a reprecipitação de minerais, na forma de fluorapatita, a qual previne adicionais perdas minerais (Wiegand et al., 2009).

Apesar de diversos estudos *in vitro* (Sorvari et al., 1994; Ganss et al., 2001; van Rijkom et al., 2003; Vieira et al., 2005; Hove et al., 2006; Lagerweij et al., 2006; Ganss et al., 2008; Wiegand et al., 2009; Yu et al., 2010a; Carvalho; Lussi, 2014) e *in situ* (Ganss et al., 2004; Schlueter et al., 2009d; Wiegand et al., 2010a; Ganss et al., 2010; Schlueter et al., 2011b; Mathews et al., 2012) terem relatado a eficácia de diferentes produtos fluoretados, em diferentes concentrações e formas de apresentação, na proteção e remineralização de lesões de erosão em esmalte dental, a estabilidade da camada de fluoreto de cálcio é muito baixa (Ganss et al., 2001).

Enquanto a presença constante de baixas concentrações de flúor no ambiente bucal é efetiva contra a cárie dental, o mesmo parece não se aplicar para a erosão dental. Larsen (2001) mostrou que o efeito preventivo do flúor, mesmo em altas concentrações, na erosão dental ainda é limitado, pois a camada de fluoreto de cálcio depositada na superfície do esmalte apresenta baixa resistência diante de desafios ácidos agressivos e seus glóbulos são rapidamente dissolvidos frente a uma redução significativa de pH, como acontece durante os desafios erosivos, em que o pH do meio é geralmente inferior a 4,5 (Ganss et al., 2001); (Larsen; Richards, 2002).

Segundo Lagerweij et al. (2006), há uma importante relação dose-resposta. A aplicação de agentes com altas concentrações de fluoretos e de maneira mais frequente e/ou prolongada têm se mostrado mais eficiente na prevenção de lesões de erosão por formar camadas de precipitados semelhantes ao fluoreto de cálcio mais espessas, densas e estáveis (Ganss et al., 2001; Ganss et al., 2004; Lagerweij et al., 2006; Wang; Lussi, 2010).

Além da concentração e do tempo de aplicação do fluoreto, Saxegaard e Rolla (1988) afirmaram que a formação dessa camada de CaF_2 e seu efeito inibidor

da desmineralização dental depende também do pH e do tipo de fluoreto presente no composto fluoretado. A deposição de fluoreto de cálcio na superfície é maior quanto maiores forem a concentração do fluoreto e a frequência de aplicação, e quanto menor o pH do agente fluoretado (Magalhães et al., 2011). Além disso, na presença de saliva, uma maior quantidade de CaF_2 pode ser formada na superfície do esmalte após aplicação de fluoretos, pois sabe-se que a saliva é um importante doador de íons cálcio e fosfato para os processos de remineralização e/ou inibição da desmineralização (Larsen; Richards, 2002). O efeito anti-erosivo dos fluoretos convencionais requer, portanto, um regime de fluoretação intensa (Ganss et al., 2001; Ganss et al., 2004; Lagerweij et al., 2006; Ren et al., 2011), o que para muitos é considerado um procedimento clínico demorado e oneroso, em virtude da quantidade de sessões clínicas necessárias para o alcance do resultado desejado.

Compostos contendo cátions metálicos polivalentes associados aos fluoretos, especialmente o fluoreto estanhoso (SnF_2), vêm sendo amplamente estudados (Young et al., 2006; Schlueter et al., 2007; van Rijkom et al., 2003; Wiegand et al., 2009) e mostram resultados mais promissores quanto ao seu potencial protetor contra a erosão dental.

O mecanismo de ação dos produtos à base de estanho baseia-se, principalmente, na deposição de estanho na superfície do dente assim como na eventual incorporação do estanho na camada subsuperficial do esmalte após longo tempo de contato com a superfície do dente (Wei, 1974).

Sabe-se que a reação do fluoreto estanhoso com a hidroxiapatita do esmalte pode resultar na formação de depósitos ricos em estanho (Sn_2OHPO_4, $Sn_3F_3PO_4$, $Ca(SnF_3)_2$ e CaF_2) e sua eventual incorporação na superfície do esmalte formam uma cobertura “protetora” e estável que pode resultar em um substrato menos susceptível à dissolução ácida (Babcock et al., 1978; Hove et al., 2006; Ganss et al., 2008; Schlueter et al., 2009b; Yu et al., 2010a).

Imagens de microscopia eletrônica de varredura também revelam a presença de depósitos amorfos na superfície do esmalte, semelhantes aos complexos de CaF_2 (Wei, 1974), porém em menor proporção em relação aos sais de estanho (Babcock et al., 1978). Estes complexos permitem a incorporação do estanho no esmalte erodido até uma profundidade de aproximadamente 20 µm, resultando na formação de uma ampla zona estruturalmente modificada, estável e resistente a desafios ácidos (Schlueter et al., 2009b). Wei (1974) já havia revelado que a

absorção de estanho e do fluoreto parecia depender do tempo de exposição do produto ao esmalte dental. Quanto mais tempo o produto fica em contato com o esmalte, mais sais de estanho são formados e maior será a resistência ácida do esmalte.

Os benefícios do íon de estanho na redução da desmineralização dental por ácidos erosivos foram revelados em diversos estudos *in vitro* (Hove et al., 2006; Ganss et al., 2008; Schlueter et al., 2009a; Schlueter et al., 2010; Ganss et al., 2012) e confirmados em outros estudos *in situ* (Ganss et al., 2004; Young et al., 2006; Schlueter et al., 2009d; Huysmans et al., 2011) que utilizaram estanho em diferentes meios de apresentação, como soluções, dentifrícios, géis e vernizes.

Ganss et al. (2008) avaliaram a eficácia de alguns cátions em diferentes compostos fluoretados como agentes anti-erosivos e mostraram que não somente o cátion, mas também o íon metálico dos compostos fluoretados desempenha um importante papel no efeito anti-erosivo, pois soluções de $SnCl_2$ (815 ppm de Sn^{2+}), NaF (250 ppm F^-), AmF/SnF_2 (250 ppm de F^-, 390 ppm Sn^{2+}) e SnF_2 (250 ppm de F^-, 809 ppm Sn^{2+}) reduziram significativamente a erosão do esmalte dental.

Schlueter et al. (2009c) compararam a eficácia de diferentes soluções contendo AmF/NaF/$SnCl_2$ - com diferentes concentrações de íons estanho e flúor e pH ajustado para 4,5 - em reduzir a perda de substrato dental em esmalte durante uma ciclagem erosiva considerada severa. As análises de perfilometria de contato mostraram que todas as soluções experimentais reduziram em 60-90% a perda de tecido quando comparado ao grupo controle, não tratado. Além disso, a concentração de flúor desempenhou um papel secundário, uma vez que em soluções com concentrações iguais de estanho, a solução com menor concentração de flúor foi mais efetiva do que a com maior concentração. Por último, os autores constataram que a eficácia das soluções testadas não depende somente das concentrações absolutas de íons estanho ou flúor, mas também da proporção entre eles. Quanto maior a proporção, maior efeito anti-erosivo terá a solução.

Schlueter et al. (2009b) submeteram amostras de esmalte humano a uma ciclagem erosiva agressiva para avaliar a eficácia de 03 soluções experimentais com pH iguais de 4,5 e concentração de flúor de 1500 ppm. As concentrações de estanho estudadas foram de 400, 1400 e 2100 ppm. Os autores reportaram que todas as soluções de estanho foram eficazes na redução da perda de tecido, mas o efeito anti-erosivo foi significativamente maior quando as concentrações de estanho

foram de 1400 e 2100 ppm. Imagens de MEV transversal e análise de Espectroscopia de Energia Dispersiva de Raios-X (EDX) mostraram que apesar de a deposição de estanho ter sido maior nas superfícies do substrato não-erodido, não houve incorporação de estanho no esmalte dental. Já nas amostras submetidas à ciclagem erosiva, ambas as soluções altamente concentradas conduziram à incorporação de estanho até uma profundidade de 20 µm. Os autores concluíram que a eficácia anti-erosiva das soluções contendo estanho não decorre da deposição de precipitados menos solúveis, mas sim a partir da incorporação de estanho, e talvez também do flúor, no tecido dental, o que resulta em uma ampla e estruturalmente modificada camada protetora, mais resistente a desafios ácidos.

Em outro estudo, Schlueter et al. (2009e) submeteram amostras de esmalte humano a uma ciclagem erosiva agressiva para avaliar a eficácia de diferentes enxaguatórios bucais contendo entre 800 e 2800 ppm de estanho e flúor nas concentrações de 250 e 500 ppm. Todos as soluções foram ajustadas para o pH 4,5 e uma solução já disponível comercialmente foi utilizada como solução controle positivo (pH 4,2, 409 ppm de Sn^{2+} e 250 ppm de F^{-}). Foi constatado que apesar de todas as soluções experimentais terem sido eficazes no controle da perda de tecido dental, a concentração dos agentes ativos pode ser reduzida sem prejudicar a eficácia do produto. Isto evitaria a exposição desnecessária a elevadas concentrações de ingredientes ativos, bem como à desagradável sensação adstringente de soluções altamente concentradas. Os autores sugeriram ainda que a combinação de 800 ppm Sn^{2} e 500 ppm de F^{-} parece ser eficaz e ter melhor aceitação entre possíveis usuários.

Os achados de Schlueter et al. (2010) também corroboram com os resultados dos estudos acima mencionados. A aplicação de soluções à base de estanho reduziu a perda de tecido entre 65% a 78%, revelando ainda que a eficácia destas soluções está diretamente associada com a concentração de seus ingredientes ativos.

Ganss et al. (2010) foram os primeiros a propor uma fórmula de apresentação comercial para as soluções à base de $AmF/NaF/SnCl_2$ (Elmex Erosion Protection®, GABA, Therwil, Suiça), contendo 500 ppm de Flúor e 800 ppm de Sn^{2+}. O produto reduziu a perda de esmalte em 67%, mesmo diante de condições severas de erosão *in situ*, e não apresentou efeitos adversos, sugerindo sua indicação não somente para pacientes de alto risco, mas também em pacientes com sinais clínicos iniciais

de perda de substrato dental. Yu et al. (2010b) e Rakhmatullina et al. (2013) confirmaram o potencial dessa solução em inibir a erosão *in vitro*.

Um dos grandes problemas das soluções à base de estanho é a sua instabilidade em pH menores que 4,5. Por esse motivo, o fluoreto de amina é incorporado nessas soluções devido às suas propriedades estabilizadoras (Mühlemann; Saxer, 1981, apud Schlueter et al., 2009b). Não há relatos na literatura de reações sistêmicas adversas por produtos à base de estanho. A absorção do estanho inorgânico pelo trato gastrointestinal é muito limitada e é rapidamente eliminado, sendo, portanto seguro para uso como enxaguatório bucal (European Food Safety Authority, 2005, apud Schlueter et al., 2009b).

2.4 Laser de CO_2

Diferentes tipos de lasers de alta potência, como laser de CO_2 (Rechmann et al., 2011, 2013) Nd:YAG (Harazaki et al., 2001; Zezell et al., 2009; Raucci-Neto et al., 2015) e argônio (Blankenau et al., 1999) com diferentes modos de operação e parâmetros de irradiação tem-se mostrado uma alternativa clínica promissora para prevenção de perda mineral do esmalte dental frente a desafios cariogênicos.

Os lasers de CO_2, disponíveis nos comprimentos de onda de 9,3 µm a 10,6 µm, são altamente absorvidos pelos componentes da estrutura dental por produzirem radiação laser na região do espectro eletromagnético do infravermelho, o que coincide com as bandas de absorção dos grupos fosfato, carbonato e hidroxila da apatita do esmalte (Featherstone et al., 1998).

Dependendo do comprimento de onda e dos parâmetros de irradiação, o laser de CO_2 pode inibir a formação de lesões de cárie em esmalte na ordem de 40 a 98% (Featherstone et al., 1998; Kantorowitz et al., 1998; Hsu et al., 2000; Klein et al., 2005; Steiner-Oliveira et al., 2006; Esteves-Oliveira et al., 2009). No entanto, o real mecanismo de ação dos lasers de CO_2 na inibição da desmineralização diante de desafios cariogênicos permanece incerto. Algumas hipóteses têm sido propostas para explicar o aumento da resistência ácida do esmalte dental após a irradiação com esses lasers, e todas estão diretamente relacionadas com o aumento de

temperatura na superfície do tecido dental (Nelson et al., 1987; Featherstone et al., 1998; Hsu et al., 2000).

A primeira hipótese baseia-se na redução da permeabilidade e solubilidade do esmalte causada pela evidência morfológica de selamento físico resultante da fusão, derretimento e recristalização dos cristais de hidroxiapatita do esmalte, reduzindo os espaços interprismáticos e formando uma barreira parcial que dificultaria a difusão de ácidos para o interior do tecido (Stern et al., 1972; Nelson et al., 1986b; Nelson et al., 1987; Zuerlein et al., 1999; Klein et al., 2005). No entanto, Nelson et al. (1987) observaram que a análise química da fina camada (profundidade máxima de 5 µm) fundida e recristalizada pelo efeito da irradiação com laser de CO_2, nos comprimentos de onda de 9,3, 9,6, 10,3 e 10,6 µm, identificou a presença de monóxido de difosfato tetracálcio [$Ca_4(PO_4)_2O$] – um composto mais solúvel que a apatita do esmalte. Uma apatita com quantidade reduzida de carbonato em sua composição, menos solúvel em relação à hidroxiapatita do esmalte, também foi observada na zona de esmalte recristalizada.

A segunda hipótese está relacionada com a alteração e eventual decomposição da matriz orgânica interprismática em temperaturas inferiores a 400°C. Precipitados globulares, frutos da decomposição dessa matriz, podem selar os espaços inter e intraprismáticos do esmalte, bloqueando a entrada de íons ácidos e formando um reservatório mineral, o que reduziria os efeitos da desmineralização dental (Nelson et al., 1986a,b; Hsu et al., 2000).

A terceira hipótese, mais aceita atualmente, baseia-se nas modificações na estrutura química do esmalte dental, tais como decomposição de proteínas e evaporação do carbonato e formação de pirofosfatos, os quais são compostos fosfatados, que embora sejam semelhantes à hidroxiapatita, são menos solúveis em ácido do que o esmalte não-irradiado (Nelson et al., 1987; Featherstone; Nelson, 1987; Featherstone et al., 1998; Zuerlein et al., 1999; Fried et al., 1997; Rodrigues et al., 2004). Há autores ainda que relataram transformação de hidroxiapatita em fluorapatita quando da presença de agente fluoretado simultaneamente à irradiação com laser de CO_2 (Meurman et al., 1997).

Diversos estudos já mostraram que a inibição da desmineralização do esmalte pode ser potencializada quando da associação da irradiação com laser de CO_2 com agentes fluoretados, sob suas diversas formas disponíveis (Fox et al.,

1992b; Hsu et al., 1998; Hsu et al., 2001; Hossain et al., 2002; Tepper et al., 2004; Rodrigues et al., 2006; Tagliaferro et al., 2007; Chen; Huang, 2009).

Oho e Morioka (1990) sugeriram que a irradiação com laser seria capaz de aumentar o processo de difusão dos íons flúor, aumentando a absorção desses íons pelo esmalte dental. O efeito protetor do agente fluoretado pode ainda ser potencializado na ausência de matriz orgânica interprismática, uma vez que a sua remoção disponibiliza uma maior área de superfície do cristal de apatita para adsorver mais íons flúor e até íons cálcio (Robinson et al., 1990).

Yokoyama et al. (2001) afirmaram que a formação de microespaços devido à possível remoção dos componentes orgânicos e do carbonato pela irradiação com laser de Nd:YAG, poderiam agir como sítios para deposição de íons flúor, liberados quando da interação do agente fluoretado com o esmalte dental, supondo então que a absorção de flúor pelo esmalte irradiado pode ser maior do que pelo esmalte não-irradiado.

Segundo Mathew et al. (2013), o possível efeito sinérgico entre o tratamento com laser de CO_2 associado ao flúor produz numerosos precipitados esféricos, morfologicamente semelhantes ao CaF_2, e também favorece a incorporação de flúor na estrutura cristalina do esmalte na forma de flúor fortemente ligado – fluorapatita - tornando-o mais resistente a desafios ácidos (Meurman et al., 1997).

As diferentes alterações químicas e físicas produzidas pela irradiação com laser de CO_2 dependem diretamente da temperatura alcançada na superfície do tecido dental (Fowler; Kuroda, 1986). Os efeitos térmicos da irradiação promovem uma redução da quantidade de água, proteínas e carbonato no tecido em diferentes graus. A partir de 100°C, ocorre o início da remoção do carbonato, sendo a sua remoção completa efetivada em 1.100^{o}C (Fowler; Kuroda, 1986). Em temperaturas entre 100°C – 650°C, o carbonato é convertido em fosfato seguido da decomposição de proteínas. Nesta mesma faixa de temperatura, também é possível verificar a conversão de fosfato em pirofosfatos (Featherstone; Nelson, 1987). Entre 650 e 1.100°C observa-se recristalização térmica e aumento dos cristais da apatita, e em temperaturas acima de 1.100°C, pode-se observar o derretimento (*melting*) da hidroxiapatita e formação de novas fases cristalinas como o α-TCP (alfa-tricálcio fosfato – α-$Ca_3(PO_4)_2$), β-TCP (beta-tricálcio fosfato – β-$Ca_3(PO_4)_2$) e TetCP (tetracálcio fosfato – $Ca_4(PO_4)_2O$) (Fowler; Kuroda, 1986; Kuroda; Fowler, 1984).

Como citado anteriormente, o carbonato é considerado a impureza que mais confere solubilidade ao esmalte (Featherstone, 1999). Sua remoção através dos efeitos fototérmicos da irradiação com laser de CO_2, portanto pode ser considerada uma medida alternativa eficaz para o aumento da resistência ácida do esmalte dental.

Estudos de microscopia eletrônica de varredura revelaram que os efeitos superficiais do laser de CO_2 no esmalte são diretamente relacionados ao seu coeficiente de absorção e comprimento de onda. Os comprimentos de onda de 9,3 µm e 9,6 µm são mais eficientemente absorvidos pela superfície do esmalte, por coincidirem com a banda de absorção do fosfato quando comparado com os comprimentos de ondas de 10,3 µm e 10,6 µm (Featherstone; Nelson, 1987; Nelson et al., 1987; McCormack et al., 1995).

O laser de CO_2 de 10,6 µm apresenta uma profundidade de absorção pelo esmalte quase 10 vezes maior, sendo portanto quase 10 vezes menos absorvido (825 cm^{-1}) em relação ao de 9,6 µm (8.000 cm^{-1}). Isso resulta em maiores profundidades de penetração e espessura do esmalte modificado (aproximadamente de 12 µm), após irradiação com laser de CO_2 (10,6 µm) (Fox et al., 1992a; Featherstone, 2000; Fried et al., 2001). O laser de CO_2, nos comprimentos de onda de 9,3 e 9,6 µm, apresenta, portanto, efeitos mais superficiais, visto que quanto menor o coeficiente de absorção, menor o potencial do laser em causar aumento de temperatura no local irradiado e, consequentemente, mais superficial será o seu efeito no tecido (Seka et al., 1995). Segundo Featherstone e Nelson (1987), para a indução de mudanças químicas na estrutura do esmalte dental, o ideal é que a irradiação com laser de CO_2 seja altamente absorvida na superfície, de forma que a quantidade de calor possa ser gerada, porém restrita a uma pequena profundidade do tecido, para evitar injúrias ao tecido pulpar.

Além do comprimento de onda, a densidade de energia da radiação laser, a duração do pulso, o número de pulsos, a taxa de repetição e o modo de emissão (contínuo ou pulsado) são igualmente importantes para provocarem as mudanças químicas necessárias para redução da susceptibilidade do esmalte à desmineralização ácida (McCormack et al., 1995; Kantorowitz et al., 1998; Zuerlein et al., 1999).

Featherstone et al. (1998) reportaram que densidades de energia relativamente baixas, na ordem de 2,5 a 5 J/cm^2, foram eficazes em inibir a

progressão da cárie nos comprimentos de onda de 9,3 e 9,6 µm. Estas densidades de energia, com taxa de repetição de 10 Hz e 25 pulsos, produziram um aumento de temperatura de aproximadamente 1°C até uma profundidade de 2 mm no esmalte dental. Para estes autores, as condições ideais para uso clínico seriam aquelas que alcançassem a maior inibição da lesão de cárie com a menor deposição de energia, não prejudicial aos tecidos subjacentes.

Segundo Steiner-Oliveira et al. (2006), a irradiação do esmalte com laser pulsado de CO_2, com comprimento de onda de 10,6 µm e densidades de energia de 10,0 e 11,5 J/cm^2 produz alterações químicas e morfológicas suficientes para inibir a desmineralização frente a um desafio cariogênico, sem comprometimento da vitalidade pulpar, uma vez que as temperaturas intrapulpares estiveram abaixo de 3°C (Zach; Cohen, 1965).

O laser de CO_2 funciona em modo de não-contato com a superfície a ser irradiada e pode ser operado em modo contínuo ou pulsado. No modo contínuo, a energia é emitida continuamente com uma potência pré-definida. Já no modo pulsado, a energia é emitida em intensidade pré-determinada e com um número definido de pulsos por segundo (Rodrigues et al., 2004) Acredita-se que a irradiação em modo contínuo não seja a melhor opção para aplicação clínica em virtude do excesso de calor produzido na superfície do dente e da maior propagação de calor para o interior do tecido dental, o que poderia causar injúrias à polpa dental por superaquecimento (Featherstone; Nelson, 1987; Hossain et al., 1999; Fried et al., 2001; Tepper et al., 2004). Já o modo pulsado da irradiação a laser torna-se vantajoso por fornecer alta densidade de energia por um curto período de tempo, com tempo de intervalo entre os pulsos suficiente para que o calor gerado possa ser dissipado (relaxamento térmico), de tal forma que a propagação de calor para as camadas internas do tecido, é reduzida (Fried et al., 2001, 2006).

O esmalte irradiado com laser de CO_2, no comprimento de onda de 9,3 – 9,6 µm, apresenta tempo de relaxamento térmico de apenas 1 µs (Zuerlein et al., 1999). Quanto mais próxima a duração de pulso estiver deste tempo, mais localizado será o efeito térmico do laser no tecido dental, diminuindo a difusão de calor para o interior do substrato. Caso a duração de pulso seja maior que o tempo de relaxamento térmico, poderá ocorrer a ablação, efeito indesejável quando o objetivo é inibição de desmineralização (McCormack et al., 1995; Featherstone et al., 1998; Zuerlein et al., 1999; Rodrigues et al., 2004).

Recentemente, estudos clínicos com laser de CO_2 com comprimento de onda de 9,6 µm foram realizados na área de prevenção de cárie. Rechmann et al. (2011), em um primeiro estudo *in vivo*, revelaram, através de ensaio clínico, que o aumento da resistência à desmineralização do esmalte pode ser alcançado com irradiação com laser de CO_2, 9,6 µm, taxa de repetição de 20 Hz, densidade de energia de 4,5 ± 0,5 J/cm^2 e emitindo pulsos na ordem de microsegundos (20 µs), sem qualquer dano ou injúria pulpar.

Em outro estudo clínico, Rechmann et al. (2013) mostraram que a irradiação do esmalte com o mesmo equipamento laser e mesmos parâmetros utilizados no estudo anterior, em combinação com agente fluoretado, inibiu consideravelmente a formação de lesão de cárie em fissuras de molares *in vivo*, quando comparado com o dente controle, não-irradiado.

Considerando que a erosão dental também é um processo de desmineralização de tecido duro dental e que a maioria dos estudos ainda está voltada para o entendimento dos efeitos do laser de CO_2 na inibição das lesões de cárie, existem poucos relatos sobre o efeito deste laser na prevenção e/ou controle da erosão dental (Wiegand et al., 2010b; Steiner-Oliveira et al., 2010; Esteves-Oliveira et al., 2011; Esteves-Oliveira et al., 2012; Ramalho et al., 2013; Ramos-Oliveira et al., 2014). Todos estes estudos utilizaram o laser de CO_2 com o comprimento de onda de 10,6 µm e, apesar da diversidade de metodologias entre eles, os resultados ainda são conflitantes e revelam a necessidade de estudos de novos parâmetros de irradiação, para o alcance máximo de inibição da desmineralização e o mínimo de danos térmicos na estrutura dental.

Até o momento apenas 02 estudos (Lepri et al., 2014, 2015) avaliaram *in situ* o efeito do laser de CO_2 na erosão em esmalte dental. Ambos utilizaram o laser de CO_2 no comprimento de onda de 10,6 µm. Lepri et al. (2014) verificaram que o laser de CO_2 não foi eficaz em controlar a progressão das lesões de erosão em esmalte causada por ácido cítrico 1% (pH 2,3). Lepri et al., 2015 reportaram que o laser de CO_2 e o gel de TiF_4 foram eficazes em reduzir a permeabilidade do esmalte à solução erosiva (suco de laranja, pH 3,84); no entanto, nenhum benefício adicional foi verificado quando ambos os tratamentos foram associados.

Até a presente data, não existem resultados conclusivos que suportam o uso dos lasers de CO_2 na prevenção ou inibição da progressão da erosão dental, limitando o seu uso na prática clínica. Levando em consideração os resultados

promissores da irradiação do laser de CO_2 para prevenção de lesões de cárie e que, os poucos estudos que avaliaram o laser de CO_2 na prevenção da erosão, utilizaram o comprimento de onda de 10,6 µm, um modelo *in situ* foi proposto para o presente estudo com o objetivo de avaliar o efeito da irradiação do esmalte dental bovino com um laser de CO_2 (λ = 9,6 µm), associado ou não à solução de AmF/NaF/$SnCl_2$, na prevenção de lesões de erosão dental.

Proposição

3 PROPOSIÇÃO

Este estudo *in situ* teve como objetivo avaliar o potencial da solução de AmF/NaF/$SnCl_2$, associada ou não ao laser de CO_2, em controlar a erosão em esmalte dental bovino.

Hipóteses Nula

4 HIPÓTESES NULA

As hipóteses nula testadas foram:

1. A solução de AmF/NaF/$SnCl_2$ e a irradiação do esmalte dental bovino com o laser de CO_2 (9,6 µm) não são capazes de aumentar a resistência ácida do esmalte dental e controlar lesões de erosão.

2. Não há efeito sinérgico entre o uso do produto fluoretado (solução de AmF/NaF/$SnCl_2$) e a irradiação do esmalte dental com o laser CO_2 (9,6 µm) no aumento da resistência ácida desse substrato, diante de desafios erosivos *in situ*.

Material e Métodos

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Aspectos éticos

O protocolo desta pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (Parecer 206.317 de 22/02/2013 – Anexo A). Cada participante foi informado dos objetivos e metodologia do estudo, benefícios e possíveis riscos envolvidos no experimento e da confidencialidade dos dados. Todas as informações estiveram presentes na Carta de Informação ao Paciente (Apêndice A) e no Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndice B), os quais foram assinados em duas vias, pertencendo uma ao voluntário, e outra aos pesquisadores.

No presente estudo foram utilizados 100 incisivos bovinos (animais da espécie Nelory) estritamente utilizados para fins desta pesquisa e cedidos pelo Frigorífico Mondelli (Bauru, SP, Brasil). Este estudo também foi submetido à Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, sendo considerado isento de análise por utilizar dentes bovinos oriundos de frigorífico, conforme certificado emitido em 28/04/2014 (Anexo B).

5.2 Locais da Pesquisa

O presente estudo foi realizado no Departamento de Dentística da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (São Paulo, SP, Brasil) sob orientação da Profa. Dra. Patricia Moreira de Freitas, e no Departamento de Dentística Preventiva e Restauradora da Universidade da Califórnia, em São Francisco (UCSF, São Francisco, CA, EUA), sob supervisão do Prof. Dr. Peter Rechmann. Ressalta-se aqui que apesar do envolvimento de universidade estrangeira na parte laboratorial do estudo, não houve necessidade da avaliação do

projeto de pesquisa pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP), por se tratar de estudo envolvendo amostras de origem bovina.

5.3 Cálculo Amostral

O cálculo amostral foi baseado em literatura recente relacionada à análise perfilométrica de lesões de erosão em esmalte, com metodologia similar ao presente estudo *in situ*. Assim, com base do estudo de Schlueter et al. (2013), no qual houve perda média de esmalte dental de 11 µm no grupo controle com desvio padrão de 4 µm, para atingir um poder de teste de 80%, seriam necessários 11 voluntários, considerando um nível de significância de 5%. Desta forma, contando com possíveis desistências e intercorrências, treze voluntários foram selecionados para participar desta pesquisa.

5.4 Desenho Experimental

O presente estudo *in situ* envolveu um desenho em blocos (voluntário) no qual 13 voluntários utilizaram dispositivos intra-bucais removíveis contendo amostras, em duplicata, de esmalte dental bovino.

As variáveis de resposta consideradas foram: desgaste da superfície de esmalte (n = 13, avaliada quantitativamente por perfilometria óptica) e espessura da zona desmineralizada abaixo da lesão de erosão dental (n = 13, avaliada quantitativamente por ultramicrodureza transversal). Para cada uma dessas variáveis foi considerado um desenho experimental distinto.

5.4.1 Perfilometria Óptica

O fator de estudo envolvido nesse item foi o método de prevenção de lesão de erosão em 4 níveis (n = 13):

GC – nenhum tratamento (controle negativo);

GF – solução de AmF/NaF/$SnCl_2$ (Elmex® Erosion Protection Dental Rinse, GABA Int. AG, Therwil, Suiça) (controle positivo);

GL - irradiação com laser de CO_2;

GLF – irradiação com laser de CO_2 + solução de AmF/NaF/$SnCl_2$.

5.4.2 Ultramicrodureza Transversal

Além do método de prevenção da lesão de erosão em seus 4 níveis (n = 13), citados acima, no item 5.4.1, um outro fator de estudo também foi considerado: a espessura da zona desmineralizada abaixo da lesão de erosão, em 10 níveis (n = 13)

P1 – endentação realizada a 1 µm da base da lesão de erosão;

P2 - endentação realizada a 2 µm da base da lesão de erosão;

P3 - endentação realizada a 3 µm da base da lesão de erosão;

P4- endentação realizada a 4 µm da base da lesão de erosão;

P5 - endentação realizada a 5 µm da base da lesão de erosão;

P6 - endentação realizada a 6 µm da base da lesão de erosão;

P7 - endentação realizada a 7 µm da base da lesão de erosão;

P8 - endentação realizada a 8 µm da base da lesão de erosão;

P9 - endentação realizada a 9 µm da base da lesão de erosão;

P10 - endentação realizada a 10 µm da base da lesão de erosão.

Para que não houvesse influência de possível efeito residual dos tratamentos, o estudo foi realizado seguindo um modelo híbrido (com componentes *split-mouth* e cruzado*)* de 2 fases (4 dias cada), e um período de *wash-out* de 10 dias entre as fases. Ao final do experimento, todos os voluntários foram submetidos a todos os tratamentos.

As unidades experimentais foram compostas por 208 fragmentos de esmalte dental bovino, dos quais 104 fragmentos [13 voluntários x 04 tratamentos x 02 (duplicata)] foram utilizados para análise perfilométrica e outros 104 foram submetidos à análise de ultramicrodureza transversal.

A morfologia de superfície do esmalte dental (n = 3, avaliada qualitativamente por Microscopia Eletrônica de Varredura) também foi analisada.

5.5 Obtenção dos dentes e Preparo das amostras

Estudos na literatura afirmam que o esmalte bovino é um possível substituto do substrato humano em modelos *in situ* de erosão/abrasão dental (Meurman; Frank, 1991; Turssi et al., 2010; Yassen et al., 2011). A escolha por esmalte bovino se deve principalmente por serem facilmente disponíveis, apresentarem composição uniforme, orientação dos prismas e porcentagem em peso de cálcio equivalentes ao esmalte humano (Turssi et al., 2010; Yassen et al., 2011).

Foram utilizados 100 incisivos bovinos recém-extraídos, hígidos e sem lesões hipoplásicas, os quais permaneceram armazenados em solução de timol 0,1% (4 ºC) (Turssi et al., 2011; Ganss et al., 2011) por um período máximo de três meses após a data de extração. Os dentes foram limpos com o auxílio de curetas periodontais (Duflex, SS White, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) e submetidos à profilaxia com pedra-pomes (SS White, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) e água, com o auxílio de escovas tipo Robinson (KG Sorensen, Barueri, SP, Brasil), em baixa rotação, seguidas de lavagem com água destilada. Os dentes foram cortados em máquina de corte (Labcut 1010, Extec, Enfield, CT, EUA) no sentido transversal no limite amelocementário para a separação entre coroa e raiz dentais. As superfícies vestibulares das coroas foram então seccionadas em máquina de corte de alta precisão (Isomet 1000, Buehler Ltd, Lake Buff, Illinois, EUA) (Figura 5.1), das quais foram obtidos 02 a 06 fragmentos quadrangulares de esmalte com dimensões aproximadas de 3,0 mm de altura, 3,0 mm de comprimento e 1,5 mm de espessura (Figura 5.2). Em seguida, suas superfícies foram polidas (Ecomet 6/Automet 2 – Buehler Ltd., Lake Bluff, IL, EUA) com lixa de carbeto de silício com granulação de #800, #1200 e #4000 (Buehler Ltd, Lake Buff, Illinois, EUA – Padrão FEPA). Após cada série de polimento (diferentes granulações), os fragmentos foram lavados em água destilada-deionizada por 3 minutos em ultrassom (Kondortech®, São Carlos, SP, Brasil). Por último, todos os 436 fragmentos obtidos foram observados em Lupa Estereoscópica (MiView USB Digital Microscope, Chinavasion Wholesale, Guangdong, CN) com uma lente de aumento de 40x, e os fragmentos que apresentaram defeitos e imperfeições no esmalte foram eliminados.

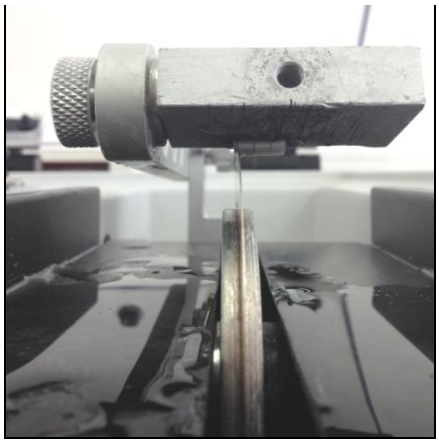

Figura 5.1 – Obtenção de fragmentos de esmalte em cortadeira de alta precisão, pertencente ao Departamento de Dentística da FOUSP

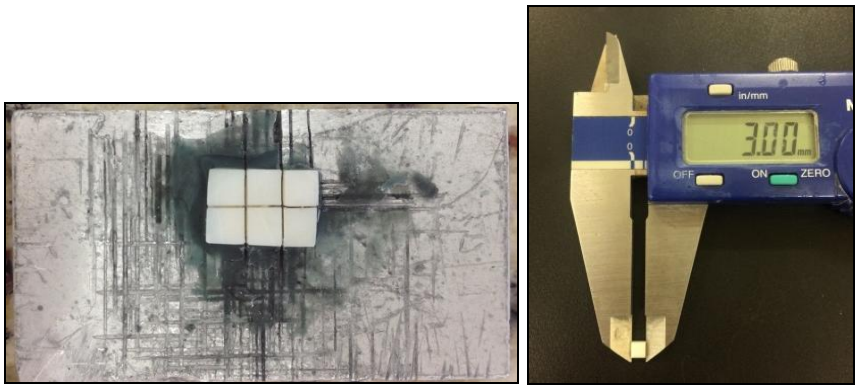

Figura 5.2 – Dimensões aproximadas dos fragmentos quadrangulares: 3,0 mm de altura x 3,0 mm de comprimento x 1,5 mm de espessura

5.6 Seleção das Amostras

Os fragmentos de esmalte, devidamente planos, paralelos e polidos, tiveram a sua microdureza superficial mensurada no início da fase experimental (*baseline*). Três edentações (Figura 5.3) localizadas a 100 µm de distância uma da outra (Lussi et al., 1995) foram realizadas na região superior esquerda de cada fragmento em microdurômetro (HMV-2000® Shimadzu Corporation, Tokyo, Japão) acoplado a um computador com software específico para análise das amostras, com penetrador diamantado piramidal do tipo Knoop, com carga estática de 0,49 N (50 g) aplicada durante 20 segundos (Featherstone, 1992; Lussi et al., 2008; Esteves-Oliveira et al., 2011). As médias dos valores de dureza foram consideradas para a seleção. Todas

as amostras que tiveram um valor médio de microdureza 10% acima ou abaixo da média de todos os fragmentos obtidos foram excluídas do estudo. Os fragmentos selecionados tiveram uma média de dureza superficial de 342 ± 29 Kg/mm^2.

Além da Análise de Microdureza de Superfície, todos os fragmentos foram analisados em perfilômetro óptico sem contato (PROSCAN 2100 3D, Scantron, Eagan, MN, EUA) para determinação da curvatura da superfície (Figura 5.4) e apenas fragmentos com valor de curvatura ≤ 0,3 µm foram selecionados para o estudo (Eisenburger et al., 2003; Turssi et al., 2014). A partir dessas análises, 208 fragmentos foram selecionados para a fase experimental.

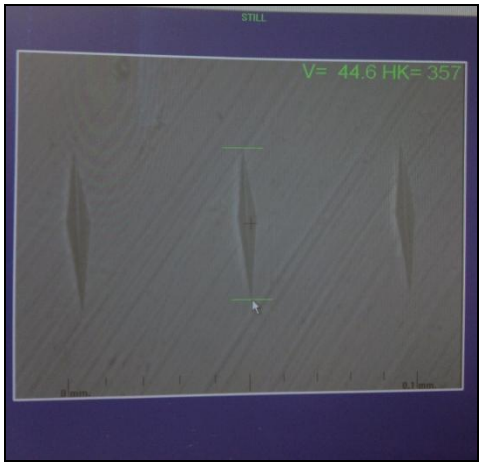

Figura 5.3 – Edentações realizadas em penetrador Knoop (0,49 N, 20 segundos) em Microdurômetro HMV-2000® Shimadzu, pertencente ao Departamento de Dentística da FOUSP

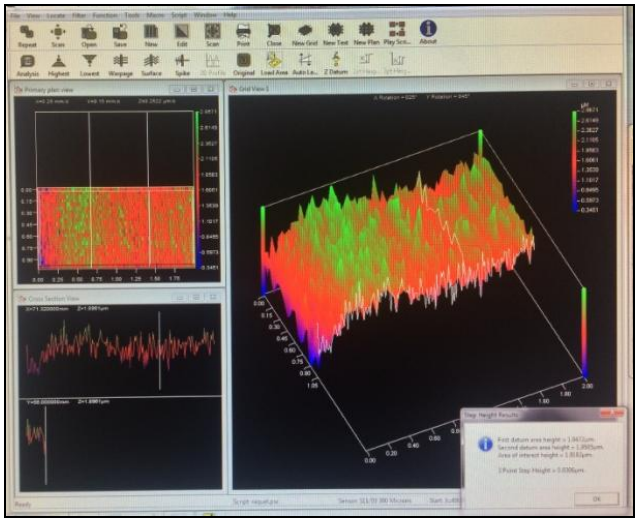

Figura 5.4 – Perfil representativo de uma superfície de esmalte com curvatura menor ou igual que 0,3 µm. Imagem obtida pelo software do perfilômetro óptico sem contato (PROSCAN 2100 3D, Scantron, Eagan, MN, EUA), pertencente ao Departamento de Dentística da FOUSP

5.7 Delimitação da Área de Estudo

Para as amostras que foram submetidas à perfilometria, 02 fitas adesivas (UPVC tapes - Graphic Tape; Chartpak, Leeds, EUA) foram aplicadas na superfície de cada fragmento de esmalte, deixando exposta uma janela central de aproximadamente 3,0 mm de comprimento x 1,0 mm de largura, para delimitação da área de estudo (Mathews et al., 2012; Turssi et al., 2014).

Nas amostras preparadas para a análise de ultramicrodureza transversal apenas 01 fita adesiva (UPVC tape - Graphic Tape; Chartpak, Leeds, EUA) foi aplicada na superfície de cada fragmento de esmalte, deixando exposta uma janela central de aproximadamente 3,0 mm de comprimento x 1,5 mm de largura (Figura 5.5). Por fim, todos os espécimes foram armazenados em umidade relativa a 4°C até o início da fase experimental.

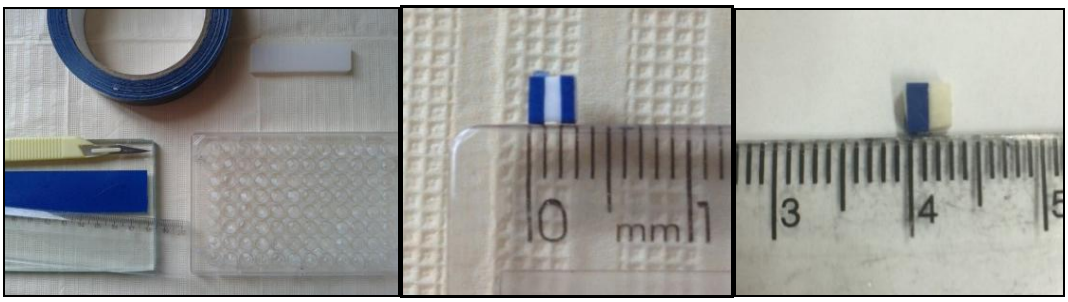

Figura 5.5 – Delimitação da área de estudo com auxílio de régua milimetrada, lâmina de bisturi e fita UPVC

Alguns estudos utilizaram esmalte de unha (Rios et al., 2006a; Magalhaes et al., 2007; Mathews et al., 2012) ou materiais como amálgama (Attin et al., 2001) ou resinas fotopolimerizáveis (Hara et al., 2003; Ganss et al., 2007a). Optou-se pelas fitas de UPVC devido à sua estabilidade documentada na literatura (Hooper et al., 2003) e, também, por ter-se mantido aderida durante todos os estudos-piloto, sem sinais de deslocamento.

5.8 Irradiação com Laser de CO_2

A irradiação das amostras dos grupos GL e GLF foi realizada com um laser pulsado de CO_2 com comprimento de onda de 9,6 µm, pertencente à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Francisco (Califórnia, EUA). O equipamento utilizado, em fase experimental, é um laser de CO_2 que permite a utilização de pequenas larguras de pulso (dezenas de microssegundos).

Os parâmetros de irradiação utilizados foram (Rechmann et al., 2013): densidade de energia de 4,5 J/cm^2, duração de pulso de 20 µs, taxa de repetição de 20 Hz, energia por pulso 0,02 J, tempo total de irradiação 25 segundos e 20 pulsos. O diâmetro do feixe laser era de 800 µm. Antes das irradiações, as amostras foram secas com papel absorvente. A energia emitida pelo laser foi mensurada antes do início das irradiações e em um intervalo de quatro amostras, utilizando um medidor de energia (Coherent FieldMaster GS + Detector LM45, Coherent, EUA).

Especificamente para a etapa de irradiação das amostras, foi desenvolvido um dispositivo metálico, com dimensões aproximadas de 2 x 2 cm, no qual foi possível estabilizar as amostras e manter as áreas de referência (hígidas) cobertas e não expostas à irradiação (Figura 5.6).

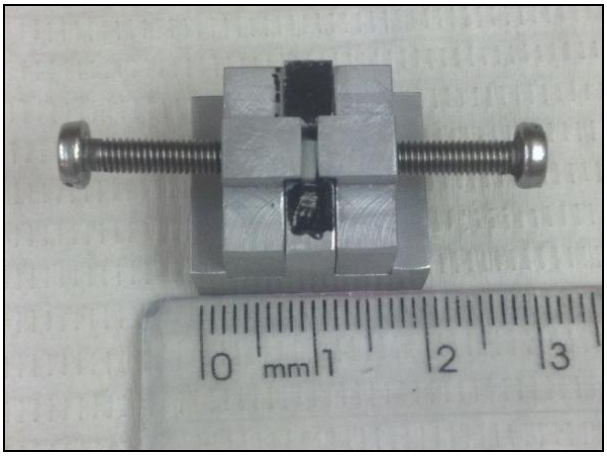

Figura 5.6 – Dispositivo especialmente confeccionado para fixação das amostras e proteção das fitas de UPVC, durante a irradiação com laser de CO_2 (9,3 µm)

5.9 Seleção dos Voluntários

Foram considerados os seguintes *Critérios de Inclusão e Exclusão* dos participantes da pesquisa:

Critérios de Inclusão:

- Idade mínima de 25 anos e idade máxima de 35 anos;
- Apresentar todos os elementos dentais;
- Apresentar boa saúde bucal (sem a presença de biofilme visível, lesões ativas de cárie ou erosão, sem doença periodontal);
- Residir na área urbana do município de São Paulo;
- Fluxo salivar estimulado > 0,7 mL/min (Ericsson; Hardwick, 1978) e pH salivar entre 7,0 e 7,5 (Ericsson; Hardwick, 1978).

Critérios de Exclusão:

- Apresentar algum tipo de patologia sistêmica;
- Apresentar dispositivo ortodôntico;
- Fazer uso sistemático de tabaco e bebidas alcoólicas;
- Mulheres grávidas ou lactantes;

Após concordância e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Apêndice B), os voluntários foram submetidos aos procedimentos experimentais.

5.10 Avaliação do fluxo salivar estimulado e pH salivar

A coleta de saliva dos participantes foi realizada no período matutino, pelo menos duas horas após a ingestão de alimentos e da escovação dental, que foi efetuada com dentifrício fluoretado e escova dental fornecidos pela pesquisadora. Para realização da coleta de saliva total estimulada, o participante foi orientado a mascar um fragmento de filme de parafina (Parafilm M®, Pechiney Plastic Packaging

Company, Chicago, IL, EUA), medindo 5,0 x 5,0 cm, durante 30 segundos e, em seguida, a deglutir a saliva inicial. Nos 5 minutos subsequentes, o voluntário foi orientado a expectorar a saliva em um copo plástico, cuja massa (em gramas) foi previamente aferida em balança digital. A massa do recipiente contendo a saliva foi aferida para obter a massa (em gramas) e, consequentemente, o volume de saliva (considerando-se a densidade da saliva igual a 1 g/cm^3). O fluxo salivar total estimulado foi obtido através da razão entre o volume e o tempo, expresso em mL/min (Ericsson; Hardwick, 1978). Imediatamente após a coleta, o pH da saliva estimulada foi mensurado, utilizando-se um microeletrodo acoplado a um pHmetro digital (Hanna HI2221 calibration check pH/Orp meter, Hanna Instruments, Woonsocket, RI, EUA). O fluxo salivar médio dos participantes foi de 0,89 ± 0,43 mL/min e o pH médio da saliva foi de 7,17 ± 0,37.

5.11 Preparo dos Dispositivos Intra-Orais Mandibulares

Para a realização da fase *in situ,* os 13 voluntários da pesquisa tiveram suas arcadas inferiores moldadas com silicone de condensação de consistência pesada (Clonage®, DFL, Jacarepaguá, RJ, Brasil). A partir dos moldes foram confeccionados modelos de gesso (Herostone®, Vigodent, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) nos quais foram confeccionados, por profissional especializado, dispositivos intra-orais mandibulares em resina acrílica. Nichos com profundidade e largura de aproximadamente 4,0 mm foram confeccionados nos dispositivos, bilateralmente, nas faces vestibulares dos dispositivos nas regiões de pré-molares e molares (Macdonald et al., 2010; Olley et al., 2012; Seong et al., 2013). Por fim, os dispositivos foram higienizados com gel de clorexidina a 2%, (Riohex 2%®, Rioquímica Ind. Farm., São José do Rio Preto/SP, Brasil) antes da fixação das amostras, com a finalidade de remoção de possíveis resíduos provenientes da fase de confecção.

5.12 Esterilização das Amostras

Previamente à inserção nos dispositivos intra-bucais, as amostras foram esterilizadas com radiação gama (Amaechi et al., 1999b; Wegehaupt et al., 2012). A fonte de irradiação consiste de um irradiador experimental de Cobalto-60, modelo Gamacell 220, pertencente ao Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN (São Paulo, SP, Brasil). A dose utilizada foi de 25 kGy, obtida após um ciclo de 21 horas de irradiação.

5.13 Posicionamento das amostras nos dispositivos

Oito amostras (quatro no dispositivo esquerdo e quatro no dispositivo direito) (Figura 5.7A) foram fixadas, com auxílio de cera pegajosa (Asfer Indústria Química Ltda., São Paulo, Brasil), nos dispositivos intra-bucais de cada voluntário. As superfícies das amostras ficaram recuadas aproximadamente 0,5 mm em relação às superfícies dos nichos (Figura 5.7B) para evitar a influência da possível abrasão pelos tecidos moles vizinhos (Hara et al., 2009).

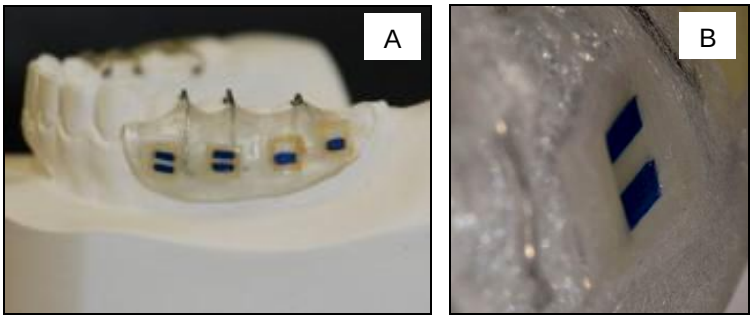

Figura 5.7 – A) Dispositivos mandibulares confeccionados em resina acrílica e grampos de retenção, B) Imagem aproximada da amostra de esmalte inserida no nicho do dispositivo intra-oral com recuo de aproximadamente 0,5 mm em relação à superfície

5.14 Procedimentos Intra-Bucais

5.14.1 Higiene bucal dos voluntários

Antes do início da etapa *in situ* e entre as fases experimentais do estudo, foram incluídos períodos de *run-in* de 2 dias (Turssi et al., 2010) e *wash-out* de 10 dias (Levy et al., 2014), respectivamente. Durante esse período, e em todas as fases *in situ*, todos os voluntários foram instruídos a realizar a escovação de acordo com a técnica de Bass e fazerem a higiene dental, sem os dispositivos intra-bucais, com o auxílio de um dentifrício fluoretado (Colgate Máxima Proteção Anti-Cáries® com 1.500 ppm F^-, Colgate-Palmolive, Osasco, SP, Brasil), escova de dentes macia n. 30 (Colgate Twister Fresh®, Colgate-Palmolive, Osasco, SP, Brasil) e fio dental (Colgate®, Colgate-Palmolive, Osasco, SP, Brasil), os quais foram doados pela pesquisadora. Os voluntários foram orientados a usar somente esses produtos durante o período do experimento, interrompendo a utilização de enxaguatórios e outros produtos de higiene bucal.

A escolha pelo uso de dentifrício fluoretado durante as fases experimentais foi baseada nos resultados de Magalhães et al. (2008). Os autores verificaram que o fluoreto residual que permanece na saliva oriundo de dentifrícios não é capaz de desempenhar um efeito eficaz contra a erosão *in situ*.

5.14.2 Desafio Erosivo *in situ*

Durante toda a fase *in situ*, todos os voluntários foram instruídos a inserir o dispositivo na cavidade bucal às 07:00h (± 30 minutos). Após 02 horas (às 09:00h ± 30 minutos), tempo necessário para a formação da película adquirida salivar (Lendenmann et al., 2000; Hannig et al., 2003; Wiegand et al., 2008b; Levy et al., 2014), foi realizado o primeiro desafio ácido da ciclagem erosiva.

Com o objetivo de aumentar a padronização do experimento e evitar o contato dos dentes naturais com a solução ácida (Wiegand; Attin, 2011), os dispositivos

intra-bucais contendo as amostras de esmalte dental bovino foram imersos extra-oralmente - 2x/dia durante 4 minutos cada – em recipientes plásticos contendo 20 mL de solução de ácido cítrico a 0,65% (pH 3,6, ácido cítrico mono-hidratado, Merck, Darmstadt, Alemanha), sem agitação (Rakhmatullina et al., 2013). Após a desmineralização, os aparelhos eram cuidadosamente secos em papel absorvente e reinseridos na cavidade bucal (Schlueter et al., 2013). A solução desmineralizadora foi descartada após cada uso (Schlueter et al., 2011b).

O segundo desafio ácido foi realizado após cinco horas (às 14:00h ± 30 minutos) do primeiro desafio. Em seguida, os dispositivos ficavam em ambiente bucal por mais cinco horas para fins de remineralização. Ao final de cada ciclagem diária, os dispositivos intra-bucais eram imersos em uma solução de clorexidina a 0,12% por 1 minuto, para evitar o crescimento de biofilme sobre os espécimes (Ganss et al., 2010; Schlueter et al., 2011b) (Figura 5.8)

Os dispositivos foram utilizados por aproximadamente 12 horas diárias (das 7h00 às 19h00) e armazenados em recipiente fechado contendo gaze umedecida em água de Mili-Q (fornecida pela pesquisadora responsável) durante as noites, as refeições e a higiene oral. Após as refeições, ingestão de bebidas e higiene oral, os voluntários aguardaram 15 minutos para reinserção do dispositivo na cavidade bucal (Ganss et al., 2004; Schlueter et al., 2011b; Schlueter et al., 2013).

Os participantes foram treinados extensivamente em relação a todos os procedimentos (em especial, os processos de imersão nas soluções, a incorporação e a limpeza dos dispositivos intra-bucais) da ciclagem diária (Figura 5.8). Além disso, receberam um protocolo escrito e cronograma de uso dos dispositivos, sendo também instruídos a não consumir alimentos ácidos durante o período de uso dos dispositivos.

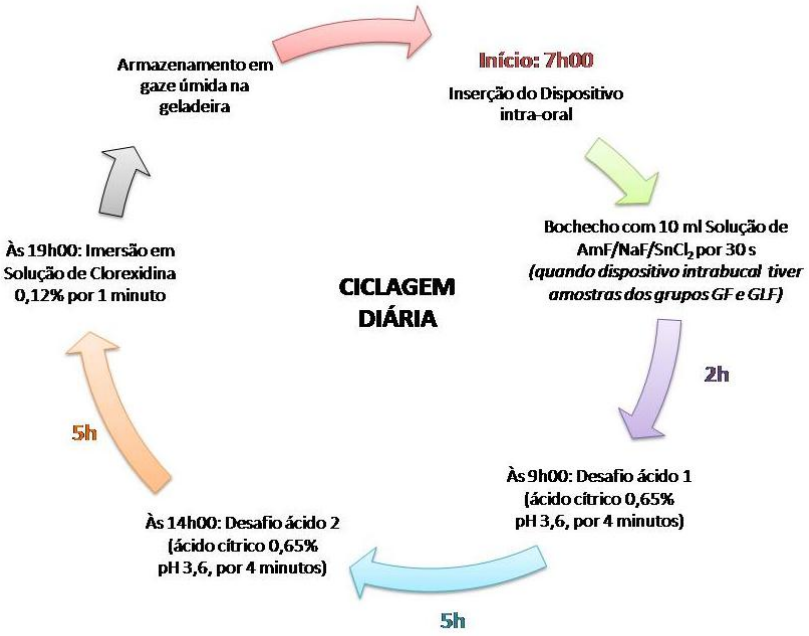

Figura 5.8 – Organograma da ciclagem diária

5.14.3 Tratamento com Solução de AmF/NaF/$SnCl_2$

Como citado anteriormente, o estudo foi realizado seguindo um modelo cruzado (*crossover)* de 2 fases (4 dias cada), e um período de *wash-out* de 10 dias entre as fases. As fases foram determinadas pela realização ou não do bochecho com solução de AmF/NaF/$SnCl_2$ pelos voluntários (Figura 5.9).

Quando os voluntários utilizaram os dispositivos contendo amostras dos grupos GF e GFL, os mesmos foram instruídos a realizar o bochecho com a solução de AmF/NaF/$SnCl_2$, uma vez ao dia, por 30 segundos, logo após a inserção dos dispositivos no início da manhã (às 7h00), durante os 04 dias da fase experimental. Após 2 h com os dispositivos em ambiente bucal (às 9h00), os voluntários realizaram a primeira imersão em ácido cítrico a 0,65%, pH 3,6, (Rakhmatullina et al., 2013; Carvalho et al., 2014) e seguiam o organograma da ciclagem diária (Figura 5.8).

A solução de AmF/NaF/$SnCl_2$ foi entregue aos participantes em frascos individualizados contendo 10 mL de solução, quantidade esta recomendada pelo fabricante.

Fase Experimental *in situ*		
	Grupos GC e GL	**Grupos GF e GLF**
Fase 1	**Participantes 1-7**	**Participantes 8-13**
	wash-out	
Fase 2	**Participantes 8-13**	**Participantes 1-7**

Figura 5.9 – Desenho híbrido da fase experimental *in situ*

5.15 Análise Perfilométrica

Para a análise da perda de tecido mineral, as fitas de UPVC ácido-resistentes foram removidas cuidadosamente da superfície do esmalte dental (Figura 5.10) e as superfícies de esmalte hígido (preservadas pela fita de UPVC) foram utilizadas como referência para análise em um perfilômetro 3D (PROSCAN 2100 3D Scantron, Taunton, Reino Unido - Processo FAPESP 2011/17699-1) (Figura 5.11).

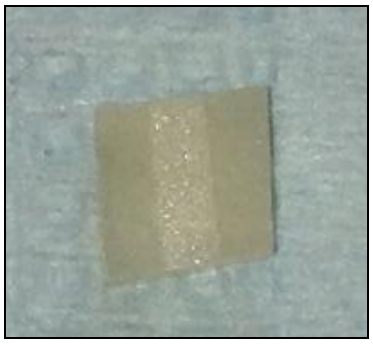

Figura 5.10 - Amostra após desafio *in situ*. Após remoção das fitas de UPVC ficam evidentes as áreas de referência utilizadas

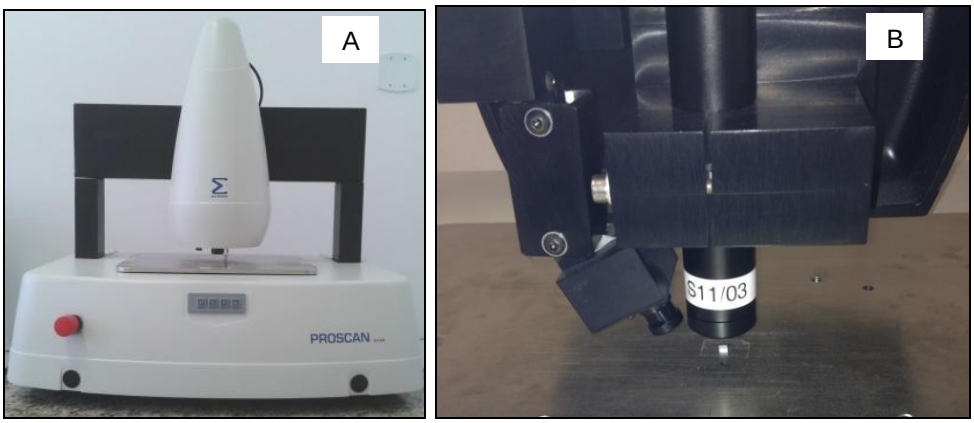

Figura 5.11 - Amostra posicionada no perfilômetro óptico 3D (PROSCAN 2100 3D Scantron)

O sensor do aparelho foi programado para escanear uma área central da amostra de 2 mm de comprimento (no eixo X) por 1 mm de largura (eixo Y) no centro da amostra (Figura 5.12A), que corresponde à área tratada e às superfícies de referência de ambos os lados. O aparelho foi ajustado de forma a percorrer 200 passos, com um tamanho de 0,01 mm, no eixo X, e 20 passos de 0,05 mm, no eixo Y. A profundidade da lesão (*3-pt step height*) foi calculada por um software específico (Proscan Application software version 2,0,17) (Figura 5.12B), com base na subtração da média da altura da área teste em relação à média da altura das superfícies de referência.

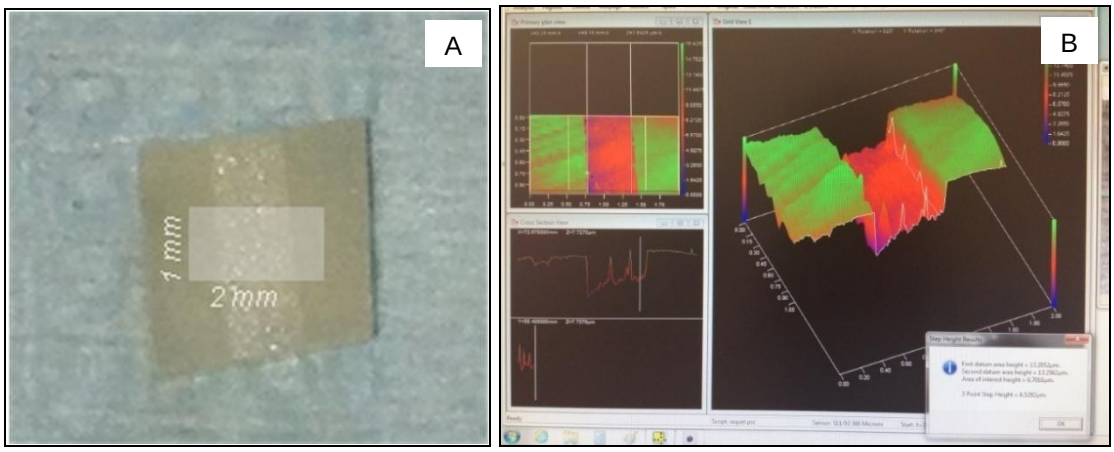

Figura 5.12 – A) Esquema ilustrativo da área da amostra escanneada pelo perfilômetro óptico. B) Imagem em 3D fornecida pelo software do perfilômetro óptico, onde as áreas de referência aparecem em cor verde e a base da lesão de erosão, em cor vermelha.

5.16 Ensaio de Ultramicrodureza Transversal

Com o objetivo de determinar a espessura de esmalte desmineralizado abaixo do tecido perdido (erodido), foi proposto o ensaio de ultramicrodureza transversal.

Inicialmente, a fita de UPVC foi removida da superfície e as amostras foram seccionadas verticalmente no sentido mésio-distal de forma que fosse possível fazer a análise tanto no esmalte hígido como no esmalte erodido *in situ*. As amostras foram incluídas em resina acrílica em matriz apropriada (Figuras 5.13A e B) e polidas com lixas d'água de carboneto de silício de granulação decrescente (#800, #1200 e #4000) (BuehlerLtd., Lake Bluff, IL, EUA - Padrão FEPA), sob refrigeração, e com auxílio de uma politriz (Ecomet 6/Automet 2 – Buehler Ltd, Lake Bluff, IL, EUA). A superfície oposta das amostras também foi planificada e polida, com auxílio de um dispositivo metálico com peso de 500 g, para padronização da força durante a planificação e polimento (Figura 5.14).

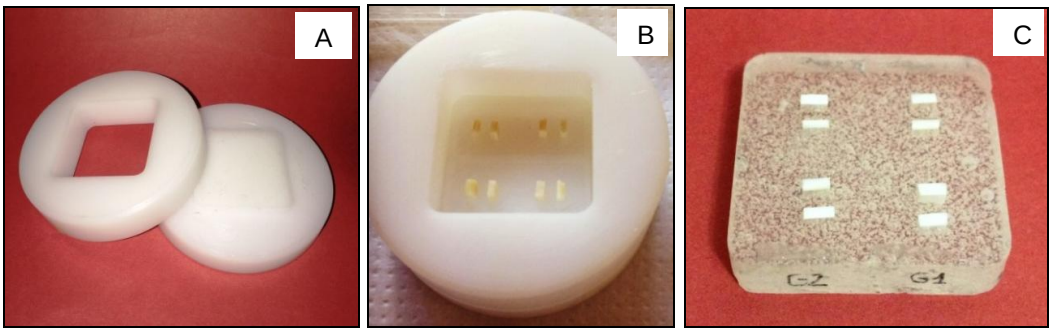

Figura 5.13 – A) Matriz plástica desmontável. B) Amostras posicionadas para a inclusão em resina acrílica ativada quimicamente. C) Amostras incluídas no sentido transversal da superfície de estudo

Figura 5.14 – Polimento das amostras com auxílio de um dispositivo de 500 gramas de peso que favorece o paralelismo entre as faces das amostras

Após o polimento, os espécimes (Figura 5.14) foram posicionados em uma máquina de teste dinâmico de ultramicrodureza (Ultramicrodurômetro DUH-211S, Shimadzu Co., Tóquio, Japão) (Figura 5.15) para medir a dureza (mN) e o módulo de elasticidade (GPa). A carga aplicada foi de 25 mN e a taxa de aplicação de força foi de 0,01 mN/µs. Antes da realização da nanoendentação, o endentador do tipo pirâmide triangular com ângulo de 115º (Bercovich) foi posicionado precisamente na região de interesse por meio de um microscópio óptico (aumento de 100x) acoplado ao equipamento. Foram realizadas 30 endentações em cada amostra na área de substrato parcialmente desmineralizado, distribuídas em 03 colunas separadas 300 µm entre si. As endentações foram realizadas ao longo de uma faixa de 10 µm abaixo da área de substrato dental perdido (base da lesão), separadas entre si, 1 µm (medições feitas a cada 1 µm, até a profundidade de 10 µm). Para que não houvesse contato entre as endentações e com o objetivo de fazer uma varredura ao longo de uma área maior, a primeira marcação de cada coluna foi localizada a 1 µm da superfície da região desmineralizada (P1) e as marcações seguintes foram realizadas, no sentido horizontal de deslocamento, a 10 µm (P2), 20 µm (P3), 30 µm (P4), 40 µm (P5), 60 µm (P6), 90 µm (P7), 130 µm (P8), 180 µm (P9) e 280 µm (P10) em relação à primeira endentação (P1), fazendo uma varredura da área desmineralizada (Figura 5.16). Para cada profundidade foram realizadas 03 medidas (distribuídas nas 03 colunas), e a média dessas medidas foi utilizada para a análise estatística. O equipamento foi utilizado sobre uma mesa antivibratória, no interior de uma caixa acrílica, para evitar possíveis influências do ambiente externo.

Figura 5.15 – Endentação do corpo de prova no equipamento ultramicrodurômetro DUH-211S, pertencente ao Departamento de Dentística da FOUSP

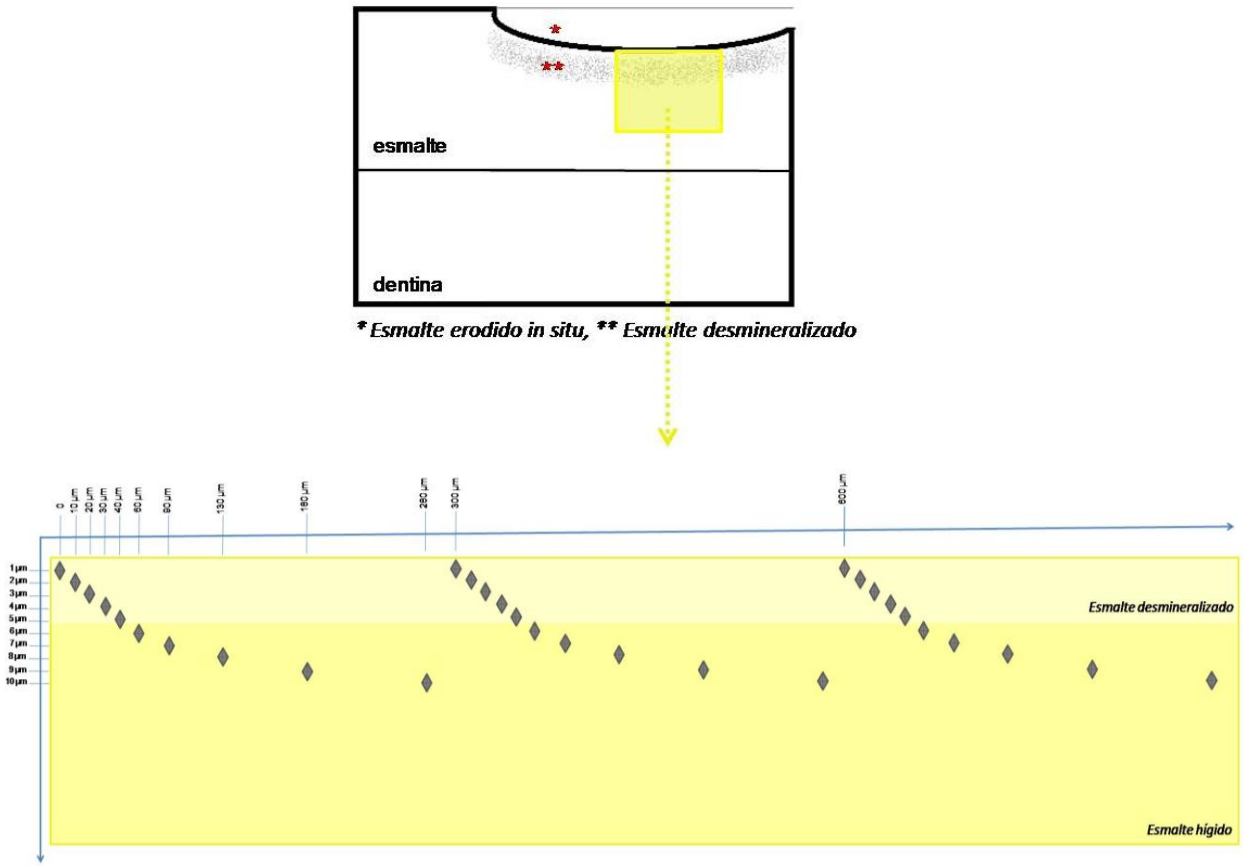

Figura 5.16 – Ilustração das nanoendentações na área desmineralizada de esmalte, abaixo da lesão de erosão

5.17 Análise em Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV)

A fim de se observar as características de superfície do esmalte após a fase *in situ*, 03 amostras representativas de cada grupo foram selecionadas, aleatoriamente, e analisadas por meio de microscopia eletrônica de varredura. Cada uma das amostras foi fixada com glutaraldeído 2% (diluído em solução tampão cacodilato 0,1 M), pH 7,4, por 24 horas em temperatura ambiente. Em seguida, as amostras foram submetidas a cinco banhos consecutivos (10 minutos cada) com solução tampão cacodilato 0,1 M (pH 7,4) para remoção do fixador e à sequência para desidratação química através da imersão em soluções crescentes de etanol 30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 95% (1 banho de 5 minutos cada) e álcool absoluto (3 banhos de 10 minutos). Posteriormente, foi feita a secagem química em solução de

HMDS a 100% por 10 minutos no interior de uma capela com exaustão e depois as amostras foram mantidas sobre papel absorvente, dentro de um dessecador, por mais 3 horas. Após a evaporação total do HMDS, foi realizada a fixação das amostras com fita dupla face de carbono em *stubs* de alumínio (Figura 5.17). Em seguida, as amostras foram mantidas em estufa (37°C) por mais 24 h para posterior recobrimento com uma fina camada de carbono (MED 010, Balzers Union, Balzers, Liechtenstein) a 39 mA por 150 segundos (Figura 5.16). As eletromicrografias de varredura foram obtidas com o auxílio do microscópio Quanta 600 FEG (FEI NE Dawson Creek Drive Hillsboro, Oregon, EUA) (Figura 5.18), utilizando-se o detector de elétrons secundários (SE), em uma escala de 3 µm e distância de trabalho de 15 mm. Em cada amostra, uma imagem de cada substrato (esmalte hígido e esmalte erodido) foi obtida em aumento de 1500x e permitiu a comparação qualitativa dos diferentes tratamentos de superfície propostos neste estudo.

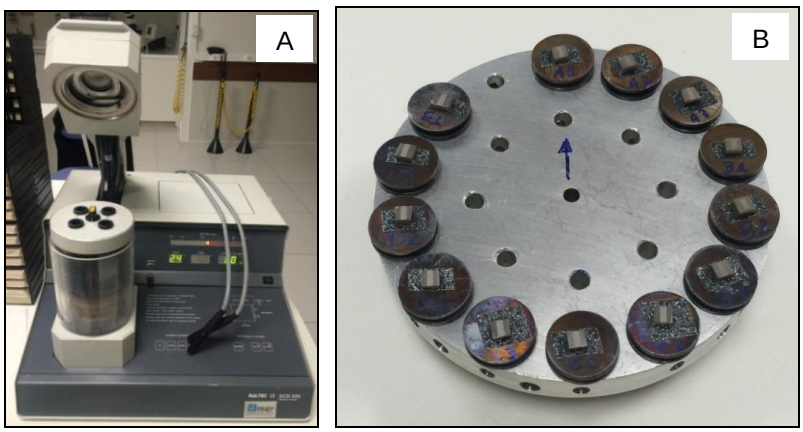

Figura 5.17 – A) Equipamento para *sputtering* das amostras (MED 010, Balzers Union, Balzers, Liechtenstein). B) Amostras recobertas com carbono e posicionadas em *stubs* metálicos no porta-amostras.

Figura 5.18 - Microscópio Eletrônico de Varredura (Quanta 600 FEG) pertencente à Escola Politécnica da USP

5.18 Análise dos Dados

Imagens obtidas na Microscopia Eletrônica de Varredura foram utilizadas para análises qualitativas e descritivas, verificando-se as alterações e características da estrutura do esmalte submetida aos diferentes tratamentos de superfície, considerando a área hígida do esmalte em cada amostra.

As variáveis de resposta consideradas foram: desgaste da superfície de esmalte (n = 13, avaliada quantitativamente por perfilometria óptica) e espessura da zona parcialmente desmineralizada abaixo da lesão de erosão dental (n = 13, avaliada quantitativamente por ultramicrodureza transversal).

Para cada uma dessas variáveis de resposta foi realizada uma análise estatística distinta. Para isso, a análise estatística foi dividida em duas partes:

5.19.1 Perfilometria óptica

A diferença entre a perda de superfície causada pelos diferentes tratamentos de superfície e a erosão *in situ* foi utilizada como resultado para cada amostra. Previamente à realização da análise estatística, a normalidade da distribuição dos dados foi verificada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov, que demonstrou haver aderência dos dados à curva normal.

Como este estudo cruzado propiciou múltiplos dados por voluntário (considerado como um bloco estatístico), os dados foram então avaliados por meio da Análise de Variância 2-fatores para medidas repetidas (ANOVA), para avaliar os efeitos das variáveis independentes (tratamento e voluntário) e sua interação com a perda de substrato (variável dependente). A comparação *post hoc* foi realizada pelo teste de Tukey. O nível de significância de 5% foi estabelecido e a análise estatística foi executada com a utilização do programa Minitab 16.1 Statistical Software (Minitab Inc., Pensilvânia, EUA).

5.19.2 Ultramicrodureza Transversal

A média das três endentações realizadas em cada profundidade do tecido erodido foi considerada para a análise estatística. Para isso, duas fontes de variação fixas, independentes do voluntário, foram consideradas: tratamento de superfície (04 níveis: sem tratamento, solução de AmF/NaF/$SnCl_2$, laser de CO_2 e laser de CO_2 + solução de AmF/NaF/$SnCl_2$) e espessura da zona parcialmente desmineralizada abaixo da lesão de erosão dental (10 níveis: P1 - 1 µm, P2 - 2 µm, P3 - 3 µm, P4 - 4 µm, P5 - 5 µm, P6 - 6 µm, P7 - 7 µm, P8 - 8 µm, P9 - 9 µm, P10 - 10 µm). Os dados foram então submetidos à Análise de Variância (ANOVA) 2-fatores (tratamento e profundidade), sendo o fator profundidade de medidas repetidas, e a comparação *post hoc* foi realizada pelo teste de Tukey.

Uma vez que houve significante fator de interação no modelo anterior, foi realizada outra análise de variância para cada tratamento de superfície separadamente. Os dados foram então submetidos à Análise de Variância (ANOVA) de 1-fator (profundidade), de medidas repetidas. As comparações múltiplas entre os níveis de profundidade foram realizadas pelo teste de Tukey.O nível de significância de 5% foi estabelecido em ambas as análises e a análise estatística foi executada com a utilização do programa Minitab 16.1 Statistical Software (Minitab Inc., Pensilvânia, EUA).

Resultados

6 RESULTADOS

Todos os participantes completaram o estudo e nenhuma amostra foi perdida. Para análise dos resultados, duas variáveis de resposta quantitativa foram consideradas: desgaste da superfície de esmalte dental e espessura da zona de esmalte parcialmente desmineralizada abaixo da lesão de erosão.

6.1 Perfilometria Óptica

Para a variável de resposta “desgaste da superfície de esmalte dental”, o fator de variação foi o tratamento de superfície em quatro níveis: sem tratamento, solução de AmF/NaF/$SnCl_2$ (Elmex Erosion®), irradiação com laser de CO_2 e irradiação com laser de CO_2 + Elmex Erosion®.

A normalidade da distribuição dos dados foi verificada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov (KS), que demonstrou haver aderência à curva normal (p = 0,571) de todos os grupos de tratamento.

O teste ANOVA dois-fatores mostrou uma interação significativa entre os fatores em estudo: voluntário e tratamento. Uma vez que o ANOVA revelou haver diferenças na perda de substrato entre os diferentes tratamentos, o teste de comparações múltiplas de Tukey foi aplicado (Quadro 6.1), considerando um nível de significância de 5%.

Os resultados mostram que a perda de substrato foi significativamente maior quando nenhum tratamento (GC = 4,8 ± 1,4 µm) ou irradiação com laser de CO_2 (GL = 4,4 ± 2,0 µm) foi realizado no esmalte; não houve diferença estatística entre os grupos que receberam tratamento com Elmex Erosion®(GF = 1,9 ± 0,9 µm) ou que bochecharam com esta solução fluoretada após a irradiação com laser de CO_2 (GLF = 1,7 ± 0,9 µm).

Quadro 6.1 – Média e desvio padrão dos valores de perda de substrato, dos grupos experimentais (µm)

Grupos experimentais (n = 13)	Tratamentos de Superfície	Média (Desvio Padrão) (µm)
GC	Nenhum tratamento	4,803 (1,409) [A]
GF	Solução de AmF/NaF/$SnCl_2$	1,892 (0,954) [B]
GL	Laser de CO_2	4,375 (2,053) [A]
GLF	Laser de CO_2 + Solução de AmF/NaF/$SnCl_2$	1,710 (0,887) [B]

**Letras iguais indicam ausência de diferença estatística (p < 0,05).*

É importante ressaltar que alterações na superfície do esmalte devido à irradiação com laser foram consideradas na análise dos resultados de perfilometria. Uma vez que a fita de UPVC foi aplicada nas áreas de referência antes do desafio erosivo *in situ*, as amostras irradiadas foram avaliadas em perfilometria e verificou-se que o laser induziu a alterações na superfície do esmalte dental, representando uma perda de substrato de aproximadamente 3,4 µm. Para que a perda de esmalte das amostras dos grupos GL e GLF, verificadas após a irradiação da superfície dental (antes da fase *in situ*), não interferissem nos resultados finais apresentados, a diferença entre a perda de superfície causada pela erosão *in situ* e o tratamento com laser de CO_2 (antes da fase *in situ*) foi considerada como resultado para cada amostra dos referidos grupos (GL e GLF).

As imagens representativas do perfil das amostras de cada grupo experimental estão ilustradas na Figura 6.1.

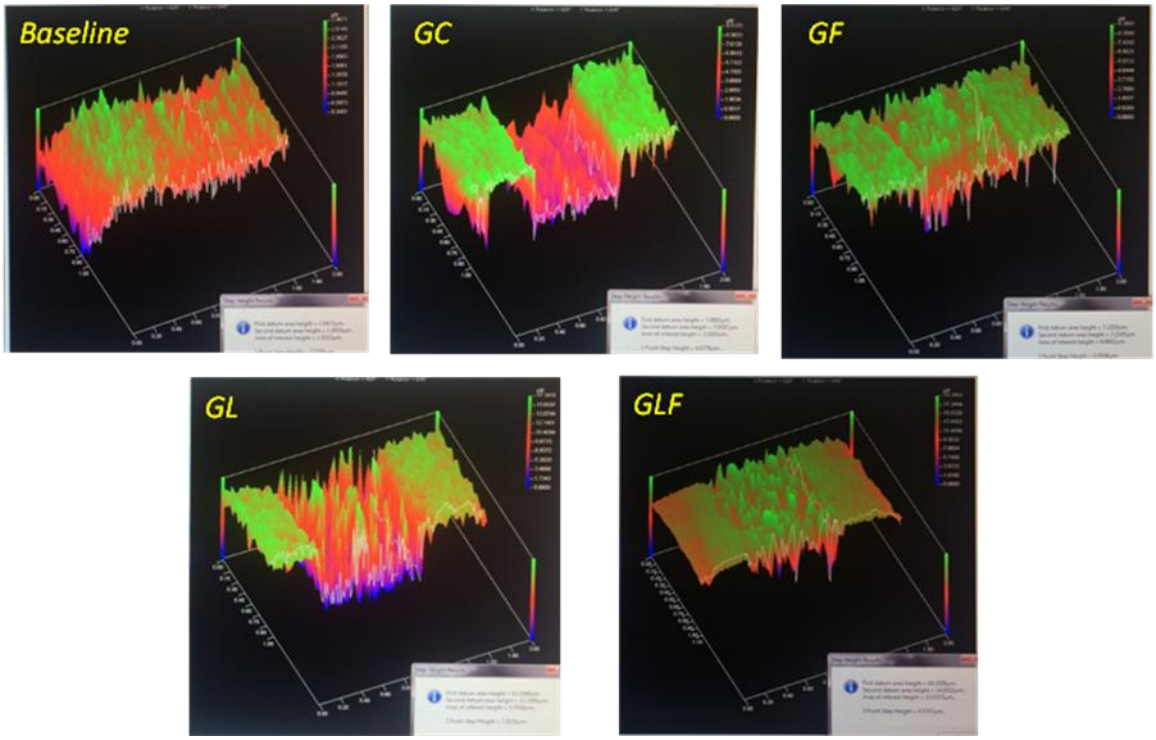

Figura 6.1 – Imagens representativas do perfil das amostras de cada grupo experimental, extraídas do software Proscan Application (software version 2,0,17)

6.2 Ultramicrodureza Transversal

O Teste ANOVA 2-fatores foi aplicado inicialmente, com o intuito de avaliar a interação entre os fatores (independentes do voluntário): tratamento de superfície (em 04 níveis: sem tratamento, solução de AmF/NaF/$SnCl_2$, laser de CO_2 e laser de CO_2 + solução de AmF/NaF/$SnCl_2$) e espessura de esmalte parcialmente desmineralizado abaixo da lesão (em 10 níveis: P1 - 1 µm, P2 - 2 µm, P3 - 3 µm, P4 - 4 µm, P5 - 5 µm, P6 - 6 µm, P7 - 7 µm, P8 - 8 µm, P9 - 9 µm, P10 - 10 µm). Nesse momento, o teste revelou uma interação significativa entre os referidos fatores de estudo ($p < 0,001$).

Uma vez que o ANOVA 2-fatores (tratamento e espessura) revelou haver diferenças na média da dureza da área de esmalte parcialmente desmineralizado (ao longo dos 10 µm) dos substratos submetidos aos diferentes tratamentos, o teste de comparações múltiplas de Tukey foi aplicado (Quadro 6.2), considerando um nível de significância de 5%.

Os resultados revelaram que as amostras tratadas com solução de AmF/NaF/$SnCl_2$ apresentaram uma zona desmineralizada com média de dureza semelhante às amostras do grupo que não receberam qualquer tipo de tratamento, com ambos os grupos (GC e GF) apresentando média de dureza significativamente maior que os grupos que foram irradiados com o laser de CO_2 (GL e GLF) ($p < 0,001$). Além disso, o tratamento com solução de solução de AmF/NaF/$SnCl_2$ não interferiu na média da dureza dos grupos irradiados ($p < 0,001$).

Quadro 6.2 – Média e desvio-padrão dos valores de ultramicrodureza transversal dos grupos experimentais

Grupos	Tratamentos de Superfície	n	Média (Desvio Padrão) (kg/mm^2)
GC	Nenhum tratamento	13	307,4 (56,1) ^{A}
GF	Solução de AmF/NaF/$SnCl_2$	13	312,2 (49,4) ^{A}
GL	Laser de CO_2	13	256,2 (49,9) ^{B}
GLF	Laser de CO_2 + Solução de AmF/NaF/$SnCl_2$	13	250,2 (46,2) ^{B}

**Letras iguais indicam ausência de diferença estatística (p < 0,05).*

Com o objetivo de analisar o comportamento da dureza ao longo da profundidade do tecido tratado e erodido *in situ*, analisou-se cada fator de tratamento separadamente, através do teste ANOVA dois-fatores, considerando 02 fatores de variação: amostra (13 níveis) e a espessura da zona parcialmente desmineralizada abaixo da lesão [em 10 níveis: P1 - 1 µm, P2 - 2 µm, P3 - 3 µm, P4 - 4 µm, P5 - 5 µm, P6 - 6 µm, P7 - 7 µm, P8 - 8 µm, P9 - 9 µm, P10 - 10 µm]. O resultado do teste revelou existir diferença estatisticamente significativa entre as medidas de dureza ao longo da profundidade do tecido em todos os grupos de tratamento ($p < 0,05$).

Para descobrir em qual profundidade aconteceu a diferença estatística nos valores de dureza, o teste auxiliar de Tukey foi aplicado individualmente para cada fator de estudo, considerando um nível de significância de 95% (Quadro 6.3).

Quadro 6.3 – Valores da ultramicrodureza transversal nas diferentes profundidades da área abaixo da lesão

Profundidade	n	GRUPO C	GRUPO F	GRUPO L	GRUPO LF
P1 – 1 µm	13	108,2 ^{F}	109,8 ^{E}	68,3 ^{F}	68,5 ^{F}
P2 – 2 µm	13	169,2 ^{E}	190,5 ^{D}	95,8 ^{EF}	108,4 ^{EF}
P3 – 3 µm	13	237,9 ^{D}	263,5 ^{C}	134,5 ^{E}	123,3 ^{E}
P4 – 4 µm	13	307,1 ^{C}	318,9 ^{B}	200,6 ^{D}	176,0 ^{D}
P5 – 5 µm	13	339,0 ^{BC}	347,0 ^{AB}	247,4 ^{D}	254,5 ^{C}
P6 – 6 µm	13	365,1 ^{AB}	364,3 ^{A}	308,8 ^{C}	287,3 ^{C}
P7 – 7 µm	13	378,8 ^{A}	376,3 ^{A}	347,2 ^{BC}	337,4 ^{B}
P8 – 8 µm	13	386,6 ^{A}	383,4 ^{A}	372,8 ^{AB}	367,8 ^{AB}
P9 – 9 µm	13	393,2 ^{A}	385,7 ^{A}	399,7 ^{A}	383,7 ^{A}
P10 – 10 µm	13	389,2 ^{A}	382,3 ^{A}	386,8 ^{AB}	395,3 ^{A}

**Letras iguais indicam ausência de diferença estatística ($p < 0,05$).*

6.3 Microscopia Eletrônica de Varredura

Para observação da morfologia do esmalte, após a fase *in situ* do estudo, três amostras representativas de cada grupo foram selecionadas para análise em Microscopia Eletrônica de Varredura, a qual foi realizada no Laboratório de Caracterização Tecnológica do Departamento de Engenharia de Minas e de Petróleo da Escola Politécnica da USP. As imagens obtidas em aumento de 1500x permitiram a avaliação da morfologia superficial de cada tratamento proposto para prevenção da erosão em esmalte dental. Cada uma das formas de tratamento superficial foi comparada e avaliada qualitativamente com a face hígida da amostra, uma vez que a área de interesse selecionada para o estudo abrangeu tanto a área que recebeu o

tratamento como a área de referência que foi protegida do desafio ácido através das fitas de UPVC.

Independente dos tratamentos de superfície realizados verificou-se uma nítida diferença na morfologia de superfície do substrato erodido em relação às superfícies hígidas das amostras (área protegida com fitas adesivas UPVC). Nas respectivas áreas hígidas (Figuras 6.1B, 6.2B, 6.3B e 6.4B), o esmalte apresentou-se preservado, com a presença de ranhuras, provavelmente provenientes da abrasão das lixas de polimento durante a fase de preparo das amostras.

As amostras do grupo controle negativo não receberam qualquer tipo de tratamento de superfície antes do desafio erosivo *in situ*. Na área exposta à ciclagem erosiva, foi formada uma estrutura irregular e rugosa semelhante ao padrão de condicionamento ácido, ficando mais evidentes os prismas de esmalte de formato hexagonal.

Nas amostras tratadas com solução de NaF/AmF/$SnCl_2$ (bochecho com Elmex Erosion® - 10 mL/30 s), verifica-se ausência de ranhuras e presença de uma superfície homogênea, aparentemente rugosa, sugestiva de uma fina cobertura composta por precipitados amorfos de estanho e de fluoreto de cálcio (Figura 6.2A).

As características morfológicas superficiais do esmalte nos grupos irradiados com laser de CO_2 apresentaram-se semelhantes em ambos os grupos GL (Figura 6.3A) e GLF (Figura 6.4A). Áreas sugestivas de derretimento e ressolidificação da superfície estiveram presentes e pequenos poros e microtrincas também puderam ser observados. A aplicação de Elmex Erosion® nas amostras do grupo GLF não evidenciou a presença da camada amorfa de precipitados de estanho e de fluoreto de cálcio.

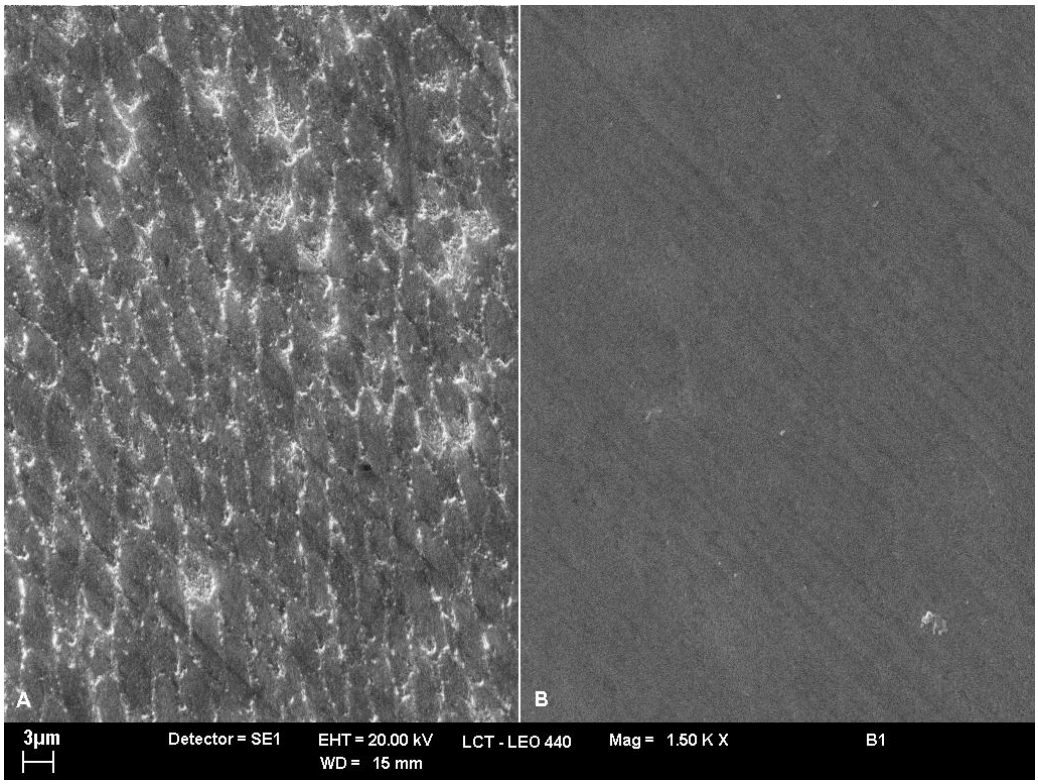

Figura 6.1 – Fotomicrografia obtida em MEV de amostra representativa do grupo GC - controle negativo. A) esmalte erodido *in situ* sem tratamento prévio do esmalte; B) esmalte hígido. Aumento de 1500x

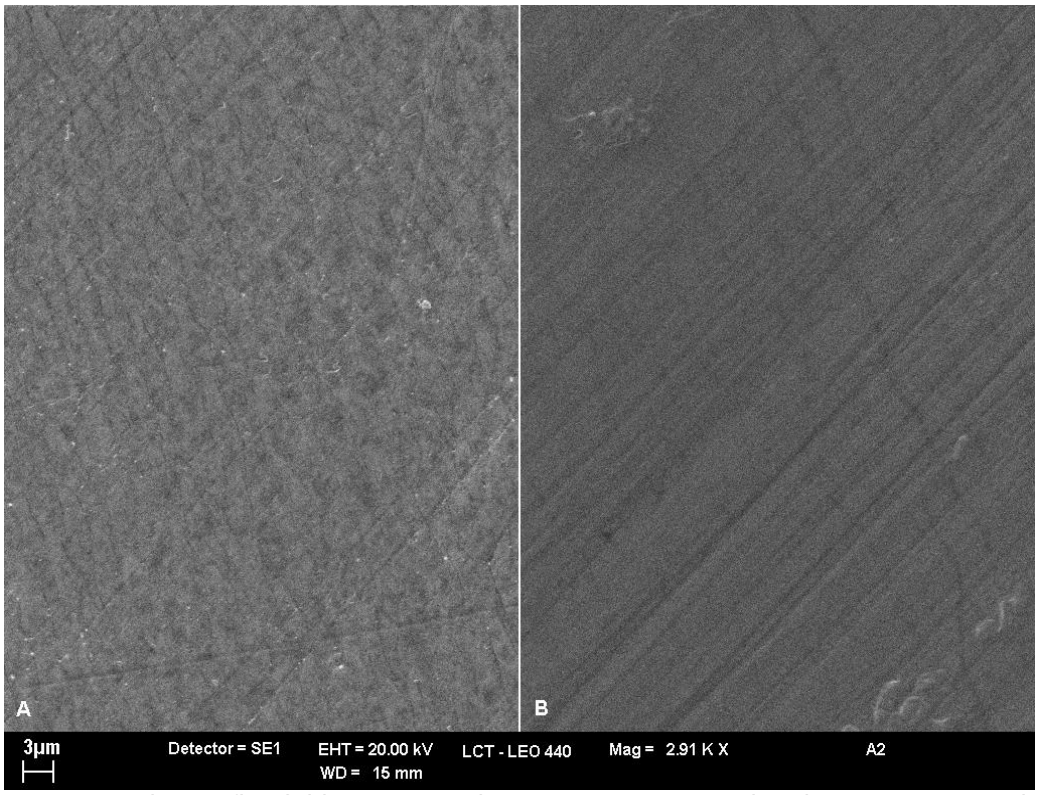

Figura 6.2 – Fotomicrografia obtida em MEV de amostra representativa do grupo GF – Solução de NaF/AmF/$SnCl_2$ (controle positivo). A) esmalte erodido *in situ* com tratamento prévio do esmalte com Elmex Erosion®; B) esmalte hígido. Aumento de 1500x.

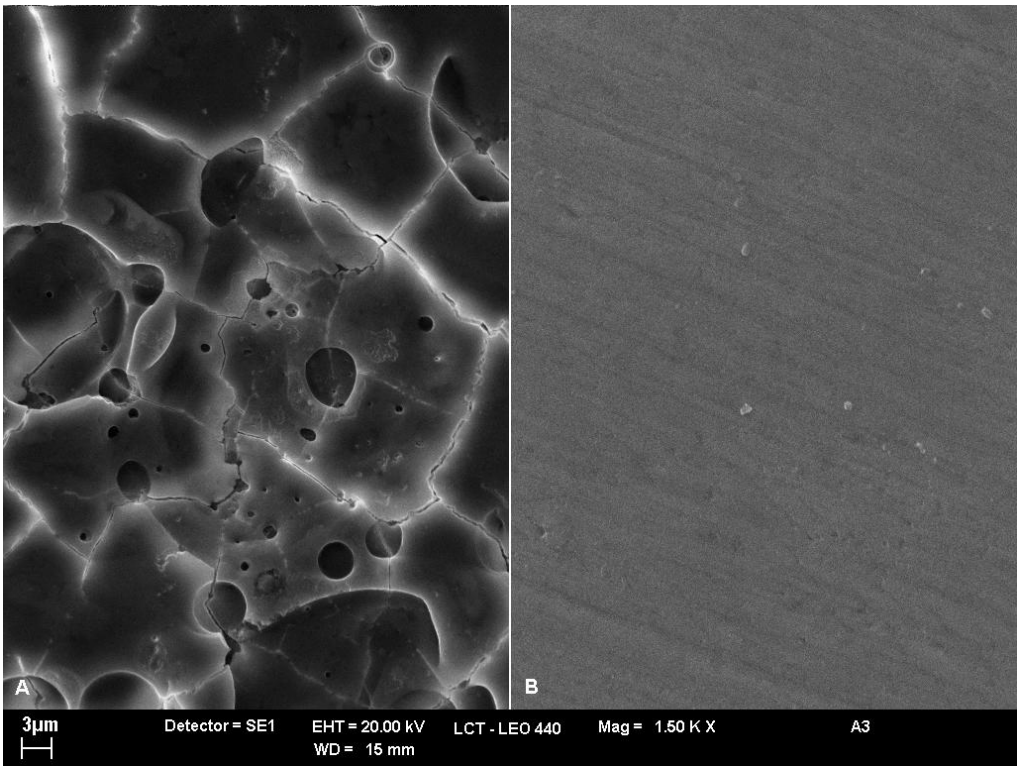

Figura 6.3 – Fotomicrografia obtida em MEV de amostra representativa do grupo GL – laser de CO_2. A) esmalte erodido *in situ* irradiado previamente com laser de CO_2; B) esmalte hígido. Aumento de 1500x

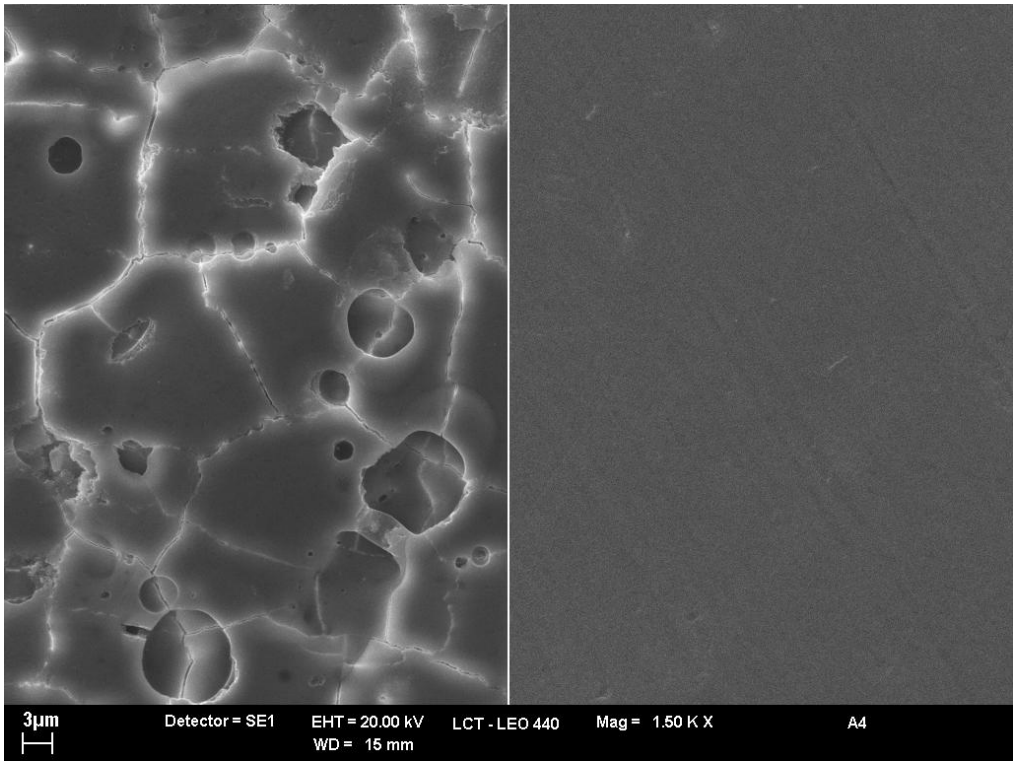

Figura 6.4 – Fotomicrografia obtida em MEV de amostra representativa do grupo G4 – laser de CO_2 + solução de AmF/NaF/$SnCl_2$. A) esmalte erodido *in situ* irradiado previamente com laser de CO_2 e submetido a bochechos com Elmex Erosion®; B) esmalte hígido. Aumento de 1500x

Discussão

7 DISCUSSÃO

O presente modelo experimental *in situ* foi desenhado para reprodução clínica de estágios iniciais da erosão dental, que consiste na desmineralização parcial da superfície do esmalte, com conseqüente redução da microdureza e amolecimento da superfície (ten Cate; Imfeld, 1996). Considerando que os estágios iniciais da desmineralização não são clinicamente detectáveis e que os indivíduos, comumente, só tomam conhecimento do processo de erosão quando já houve uma perda irreversível de tecido (Gracia et al., 2010), este estudo analisou diferentes estratégias de prevenção e/ou inibição da desmineralização do esmalte.

Embora muitas publicações tenham investigado a ação dos compostos fluoretados, contendo estanho em sua composição, na inibição da erosão dental, a maioria deles considerou estágios avançados de erosão, utilizando desafios ácidos agressivos, com perda média de esmalte dental na ordem de 23 – 147 µm (Ganss et al., 2001*,* 2004, 2007a*;* Schlueter et al., 2009d*;* Ganss et al., 2010; Schlueter et al., 2011b*;* Huysmans et al., 2011). No entanto, considerando que as medidas preventivas eficazes são essenciais nas fases iniciais de erosão, optou-se, no presente estudo, pela utilização do ácido cítrico 0,65% (pH 3,6, 2x/dia, durante 04 dias) (Rakhmatullina et al., 2013) como solução desmineralizadora do esmalte com o intuito de simular lesões de erosão incipientes (2,7 – 4,8 micrometros) (Rios et al., 2006a*,* 2008; Honorio et al., 2008), passíveis de remineralização.

Na prática, a solução ácida utilizada simula uma situação clínica durante o consumo de bebidas ácidas (Rios et al., 2008*;* Shellis et al., 2011). O ácido cítrico foi escolhido como solução desmineralizadora do esmalte por ser comumente encontrado em bebidas à base de frutas e em refrigerantes e apresentar maior potencial erosivo em relação a outros ácidos, como ácido fosfórico (West et al., 2001; Hannig et al., 2005a).

Hjortsjo et al. (2009) consideram o ácido cítrico ideal quando o objetivo é avaliar o potencial de fluoretos em prevenir erosão em esmalte dental. O seu efeito desmineralizador é bastante acentuado devido, principalmente, à sua ação quelante (Levitch et al., 1994*;* Zero; Lussi, 2005). Ele é capaz de se ligar aos íons cálcio da superfície do esmalte, formando compostos de citrato de cálcio mais solúveis, e também aos íons cálcio da saliva, reduzindo seu grau de supersaturação em relação

aos minerais do dente (Meurman; ten Cate, 1996), o que favorece ainda mais a dissolução dos cristais de hidroxiapatita do esmalte dental.

A primeira hipótese nula testada foi rejeitada. Neste estudo, a perda de esmalte dental por lesão incipiente de erosão foi reduzida pela exposição à solução de AmF/NaF/$SnCl_2$ (500 ppm F^-, 800 ppm Sn^{2+}, pH = 4,5), utilizada sozinha ou combinada com a irradiação com o laser pulsado de CO_2 (9,3 µm). O efeito inibitório da erosão dental por soluções contendo estanho também foi demonstrado *in vitro* por Ganss et al. (2008), Schlueter et al. (2009a,b,c,e) e *in situ* por Ganss et al. (2010), Hove et al. (2014) e Silva, 2015.

Evidências *in vitro* mostram que o pré-tratamento do esmalte com soluções à base de estanho pode proteger a superfície do esmalte, inibindo ou reduzindo o efeito erosivo dos ácidos, através da formação de uma espécie de “cobertura” com baixa taxa de dissolução (Ganss et al., 2001, 2008; Hove et al., 2006; Hjortsjo et al., 2009; Wiegand et al., 2009; Schlueter et al., 2011b; Ganss et al., 2011). Wei e Forbes (1974) e Babcock et al. (1978) afirmaram que íons Sn^{2+} reagem com a hidroxiapatita do esmalte superficial, reduzindo sua solubilidade através da precipitação de sais de Sn_2OHPO_4, $Sn_3F_3PO_4$, $Ca(SnF_3)_2$ ou glóbulos tipo CaF_2.

Schlueter et al. (2009b) acreditam que o tratamento do substrato com soluções contendo estanho favorece a incorporação de íons Sn^{2+} e, possivelmente, íons F^-, no esmalte, resultando em uma zona superficial estruturalmente modificada, rica em estanho e resistente a desafios ácidos erosivos.

Segundo Hjortsjo et al. (2009), o mecanismo de inibição da erosão dental pelos fluoretos metálicos está, pelo menos parcialmente, relacionado com a presença de moléculas de HF (ácido hidrofluorídrico), as quais são capazes de penetrar no esmalte e possivelmente formar moléculas de CaF_2 na matriz de hidroxiapatita. De acordo com os autores, essa camada subsuperficial, rica em fluoreto de cálcio, pode apresentar maior resistência contra os ácidos erosivos quando comparada à camada superficial do substrato.

A segunda hipótese nula do trabalho, sobre o efeito do laser na prevenção da erosão dental, no entanto, não foi rejeitada. Os resultados do desgaste superficial do esmalte dental indicaram que o laser de CO_2 com os parâmetros testados neste estudo, não foi capaz de inibir a erosão do substrato dental *in situ*, comportando-se de maneira semelhante ao grupo controle negativo, que não recebeu qualquer tratamento de superfície.

Apesar de estudos já terem demonstrado o potencial do laser de CO_2 (9,6 µm e 10,6 µm) em aumentar a resistência ácida do esmalte frente a desafios cariogênicos (Featherstone et al., 1998; Kantorowitz et al., 1998; Hsu et al., 2000; Rodrigues et al., 2004; Klein et al., 2005; Rodrigues et al., 2006; Steiner-Oliveira et al., 2006, 2008; Esteves-Oliveira et al., 2009; Chen; Huang, 2009; Souza-Gabriel et al., 2010; Rechmann et al., 2011; Rechmann et al., 2013; Cohen et al., 2014), os resultados de estudos envolvendo prevenção e/ou controle da erosão dental ainda são controversos.

Enquanto Esteves-Oliveira et al. (2011, 2012) e Lepri et al. (2013) mostraram que o laser de CO_2, isoladamente, em comprimentos de onda de 10,6 µm, foi capaz de prevenir e controlar as lesões de erosão em esmalte dental, Steiner-Oliveira et al. (2010) e Lepri et al. (2014) mostraram resultados contrários. Quanto à irradiação com laser de CO_2 com comprimento de onda de 9,6 µm não há, até o momento, nenhuma evidência de efeito preventivo contra a erosão do esmalte, como já foi reportado para prevenção de lesões de cárie *in vivo* por Rechmann et al. (2011, 2013).

No presente estudo, o laser de CO_2 foi operado no comprimento de onda de 9,6 µm. Essa faixa de comprimento de onda favorece uma absorção quase dez vezes maior do que para o comprimento de onda de 10,3 - 10,6 µm (Fried et al., 2001), o que resultaria em uma deposição bastante eficaz de energia na camada superficial do esmalte, com menor risco de dano pulpar. Para minimizar a deposição de energia acumulada e um possível aumento de temperatura da polpa, optou-se também pelo uso de pulsos curtos. Os lasers de pulsos curtos têm a vantagem de fornecer alta densidade de energia por um curto período de tempo, com tempo de intervalo entre os pulsos suficiente para que o calor gerado possa ser dissipado, reduzindo possíveis danos à polpa dentária (Fried et al., 2001). Os parâmetros de irradiação do laser foram escolhidos de acordo com estudos anteriores, *in vivo* (Rechmann et al., 2011, 2013) que mostraram menor perda de minerais do esmalte dental frente a desafios cariogênicos (inibição da lesão de cárie em esmalte dental variou de 46 a 87%), quando da irradiação com laser de CO_2 (9,6 µm) de pulsos curtos.

Uma das hipóteses que podem explicar a diferença do efeito do laser de CO_2 na inibição da lesão de cárie e da erosão dental pode estar relacionada ao fato de que os desafios ácidos envolvidos no processo de erosão são muito mais agressivos

do que no processo de desenvolvimento da lesão de cárie dental. Ambas as lesões necessitam de um meio subsaturado em relação ao mineral do dente para que ocorra a desmineralização, mas os processos diferem entre si em alguns aspectos: na erosão dental, os agentes causadores têm pH muito baixo (pH < 4,5) e raramente apresentam concentrações significativas de cálcio, fósforo e flúor, sendo, portanto, altamente subsaturados em relação ao meio (Barbour et al., 2003).

Na formação da lesão de cárie, por outro lado, o agente causador (fluido do biofilme) contém cálcio, fosfato e algum fluoreto, dificilmente apresentando-se tão subsaturado como uma solução erosiva (Honório et al., 2008). Além disso,o pH raramente cai abaixo de 4,0 - 4,5, o que é mais elevado do que no processo de erosão dental, e o fluido do biofilme é estático. Dessa forma, a troca entre íons minerais e íons hidrogênio é controlada por difusão. Levando estes fatos em consideração, a taxa de desmineralização para lesão de cárie é muito mais lenta do que no processo de erosão dental (Meurman; ten Cate, 1996; Featherstone; Lussi, 2006).

A segunda hipótese levantada para justificar as diferenças entre os resultados dos estudos realizados com o laser de CO_2 de 9,6 µm para prevenção de cárie e erosão está relacionada aos parâmetros de irradiação considerados e seus efeitos no esmalte dental. Os resultados encontrados mostraram que os parâmetros de irradiação utilizados para o laser de CO_2 não favoreceram a prevenção da lesão de erosão *in situ*. As imagens de morfologia de superfície do esmalte obtidas no presente estudo revelaram que as amostras irradiadas, independente de terem recebido ou não tratamento adicional com solução de AmF/NaF/$SnCl_2$, apresentaram uma morfologia de superfície semelhante à relatada por estudos prévios (Nelson et al., 1987; McCormack et al., 1995; Chan et al., 2014).

A visualização de áreas sugestivas de derretimento, fusão e recristalização da apatita do esmalte, e também de microporos e microtrincas na área de irradiação, decorrentes do aquecimento provocado na superfície do esmalte dental pela irradiação com laser de CO_2, sugerem que a temperatura atingida na superfície do esmalte foi maior que 1.100^{o}C. Segundo Fowler e Kuroda (1986) e Kuroda e Fowler (1984), em temperaturas acima de 1.100°C ocorre a fusão (*melting*) da hidroxiapatita e formação de novos compostos (alfa-tricálcio fosfato, beta-tricálcio fosfato e tetracálcio fosfato), mais solúveis em relação à apatita do esmalte. Ainda que nesta faixa de temperatura também ocorra a perda de carbonato da apatita do esmalte, o

que seria favorável para a redução da solubilidade desse substrato, a sua ausência não foi suficiente para inibir a desmineralização por ácido cítrico do esmalte irradiado.

Através do efeito térmico sobre o tecido dental, esperava-se que a irradiação com laser de CO_2 fosse capaz de reduzir a desmineralização ácida por erosão. Nesse contexto, microespaços formados pelo laser podem ter contribuído para que o esmalte dental ficasse mais susceptível à ação do ácido cítrico, assim como sugerido por alguns estudos que avaliaram substratos irradiados com lasers de alta potência e também verificaram a formação dessas microtrincas, devido à remoção de componentes orgânicos, água e carbonato do esmalte irradiado (Tepper et al., 2004). Apel et al. (2005) reportou que alterações morfológicas, como microtrincas e microporos, também visualizadas nas imagens de microsocopia do presente estudo, podem facilitar a infiltração das soluções ácidas e a desmineralização em regiões mais profundas do substrato.

Além das alterações observadas na superfície do substrato, os valores de dureza transversal mostraram que não apenas a superfície pode estar mais susceptível à desmineralização, mas a subsuperfície também tem seu conteúdo mineral reduzido, o que foi avaliado indiretamente pelo teste de ultramicrodureza transversal. Independente da presença dos fluoretos, a zona parcialmente desmineralizada das amostras irradiadas (GL e GLF) apresentou uma dureza média menor em relação aos grupos não irradiados. Pode-se inferir então que o grupo controle, apesar de apresentar uma superfície mais susceptível à perda de substrato (verificada através da perfilometria óptica), o conteúdo mineral da subsuperfície se mostrou semelhante ao GF.

Os dados de ultramicrodureza transversal revelaram uma área desmineralizada, abaixo da lesão de erosão, de aproximadamente 8 micrometros nos grupos irradiados (GL e GLF) e de 5 a 6 micrometros nos grupos não irradiados (GC e GF). Diante do exposto, o substrato irradiado, quando não exposto aos fluoretos, revelou-se mais susceptível à erosão e com uma faixa de zona desmineralizada maior em relação aos grupos GC e GF e semelhante ao grupo LF.

Considerando a eficácia limitada dos agentes fluoretados em inibir a perda mineral durante desafios erosivos (Larsen, 2001; Larsen; Richards, 2002) e que o fluoreto sozinho pode não ser eficaz contra a erosão de esmalte dental (Lussi et al., 2008), este estudo também avaliou o efeito da irradiação do laser de CO_2 combinada

com um agente fluoretado na desmineralização do esmalte. A hipótese nula sobre o efeito sinérgico do laser com a solução de AmF/NaF/$SnCl_2$ também não foi rejeitada. Observa-se que houve uma diminuição da dureza média da área parcialmente desmineralizada nas amostras do grupo LF, mas pelos achados da perfilometria, isso não comprometeu a perda de substrato, já que a sua perda (aproximadamente 1,7 µm) foi semelhante à perda de tecido das amostras que foram tratadas apenas com solução de Elmex Erosion®.

Ainda não há um consenso na literatura acerca do melhor momento para aplicação dos compostos fluoretados quando da associação com o laser de CO_2. A escolha para o tratamento com fluoreto após a irradiação com o laser tem como base a metodologia utilizada e resultados encontrados por outros autores (Hossain et al., 2002; ; Rodrigues et al., 2006; Tagliaferro et al., 2007); que mostraram melhores efeitos preventivos em relação ao flúor quando o mesmo foi aplicado posteriormente à irradiação. No entanto, nas amostras em que o laser de CO_2 foi associado à solução de AmF/NaF/$SnCl_2$, nenhum efeito adicional foi encontrado (Wiegand et al., 2010a; Steiner-Oliveira et al., 2010; Lepri et al., 2015), contrariando os achados prévios da literatura que mostraram sinergismo entre o laser de CO_2 (em comprimentos de onda de 10,6 µm) e diferentes produtos fluoretados diante de desafios cariogênicos (Hsu et al., 1998; Hsu et al., 2001; Chin-Ying et al., 2004; Rodrigues et al., 2004; Tepper et al., 2004; Rodrigues et al., 2006; Chen; Huang, 2009); Mathew et al., 2013) e erosivos (Lepri et al., 2015).

As amostras de esmalte irradiadas e submetidas ao tratamento com o produto fluoretado não exibiram os precipitados globulares sugestivos de sais de estanho e fluoreto de cálcio, comumente encontrados após o tratamento com soluções à base de estanho (Babcock et al., 1978; Hove et al., 2006; Yu et al., 2010a). Wiegand et al. (2010b) sugerem que isso aconteça em virtude de a irradiação com laser de CO_2 favorecer a incorporação de flúor fortemente ligado (na forma de fluorapatita) no esmalte em maior proporção do que o flúor fracamente ligado na superfície (na forma de precipitados tipo CaF_2). A ausência da camada de precipitados à base de estanho na superfície do esmalte irradiado pode justificar a ausência do efeito sinérgico entre o laser de CO_2 e o produto fluoretado. No entanto, os resultados da análise de perfilometria óptica encontrados para o grupo em que a associação dos tratamentos foi feita são semelhantes aos do grupo em que apenas a solução de AmF/NaF/$SnCl_2$ foi utilizada. Portanto, ainda que a irradiação do esmalte com o laser

CO_2 não tenha potencializado o efeito protetor da solução de AmF/NaF/$SnCl_2$, também não comprometeu a sua ação e não teve efeito antagônico.

Isso pode ter ocorrido pela permeação dos compostos fluoretados por entre os poros e microtrincas causados pela ação térmica da irradiação com o laser de CO_2, atingindo a estrutura desmineralizada abaixo do tecido erodido *in situ* (Fowler; Kuroda, 1986; Oho; Morioka, 1990). Segundo Chin-Ying et al. (2004), esses microporos e microtrincas favorecem a penetração de fluoreto de cálcio no esmalte dental, aumentando a capacidade do reservatório e da liberação de flúor no meio bucal. Estudos futuros devem ser conduzidos para avaliar as modificações químicas e estruturais que ocorrem na superfície e subsuperfície do esmalte irradiado e exposto da solução de AmF/NaF/$SnCl_2$ para elucidar os resultados encontrados.

Considerando o modelo experimental utilizado no presente estudo, *in situ*, é importante ressaltar que o bochecho com a solução de AmF/NaF/$SnCl_2$ foi realizado logo após a inserção do dispositivo intra-bucal no início de cada dia da ciclagem erosiva. Nesse momento ainda não havia uma densa e estável película adquirida salivar formada sobre a superfície da amostra de esmalte.

Sabe-se que a película adquirida salivar desempenha um importante papel no desenvolvimento das lesões de erosão dental (Hove et al., 2007; Hove et al., 2008). Uma película salivar densa e madura, além de funcionar como uma barreira de difusão, inibindo o contato direto do ácido com a superfície dental (Buzalaf et al., 2012), favorece a deposição dos sais de estanho e glóbulos semelhantes ao CaF_2, na superfície do esmalte, fornecendo ions cálcio para o meio e protegendo ainda mais o substrato durante os desafios ácidos. No entanto, estudos que avaliam o efeito *in situ* de soluções fluoretadas contendo estanho e que não consideram a presença da película adquirida, reportam diferentes resultados em relação à eficácia do produto (Schlueter et al., 2009d; Schlueter et al., 2011b; Silva, 2015).

Um estudo recente, desenvolvido pelo mesmo grupo de trabalho (dados ainda não publicados), sugere que a solução de AmF/NaF/$SnCl_2$ desempenha melhor efeito protetor quando da ausência de película adquirida madura, não interferindo na deposição de sais de estanho, flúor e fósforo, assim como dos sais de CaF_2, formados durante a interação do estanho associado a fluoretos com a hidroxiapatita. Os autores observaram que a solução de AmF/NaF/$SnCl_2$ foi mais eficaz na redução da perda de tecido mineral sob desafios erosivos quando aplicado duas vezes *in vitro* (sem considerar a formação da película adquirida antes da ciclagem ácida). Já

na fase *in situ* do estudo, a solução de AmF/NaF/$SnCl_2$, aplicada duas vezes ao dia, apresentou maior potencial em reduzir a desmineralização ácida quando comparada ao grupo controle. Ainda que os resultados para a aplicação de 1 e 2 vezes tenha sido similar, houve uma tendência para menor perda de substrato quando considerada a segunda aplicação diária. Os autores acreditam que essa tendência tenha ocorrido devido ao fato de a segunda aplicação da solução fluoretada ter sido realizada no final da ciclagem erosiva diária, quando possivelmente não havia mais película adquirida madura, concordando com outros estudos da literatura que não consideram a formação da película adquirida no modelo experimental (Ganss et al., 2010; Schlueter et al., 2009d, 2011b).

Apesar de estudos *in situ* (Hove et al., 2008; Ganss et al., 2010; Huysmans et al., 2011; Schlueter et al., 2009a, 2011b, 2013) já terem apresentado os benefícios dos produtos fluoretados à base de estanho, em suas diferentes formas de apresentação, na inibição da erosão, não há evidências, portanto, da presença da película adquirida salivar afeta a interação desses produtos fluoretados com a superfície do substrato dental. Estudos futuros são, portanto, necessários para avaliar de que maneira a presença da película adquirida salivar contribui para o efeito inibidor da erosão dos produtos fluoretados. Estudos estes que poderão esclarecer a real necessidade ou não da remoção da película salivar e/ou biofilme dental previamente à aplicação desses produtos à base de estanho no esmalte dental.

Modelos experimentais *in situ* são muito bem indicados para avaliar propriedades anti-cariogênicas de produtos fluoretados, por serem considerados um estágio intermediário entre os estudos *in vitro* e *in vivo* (Zero, 1995) e isso também é aplicável para estudos de erosão dental. Uma das variáveis experimentais bastante discutida na literatura é a origem do substrato dental a ser utilizado nos modelos *in situ*.

Dentes bovinos foram utilizados ao invés de dentes humanos, pois segundo Meurman e Frank (1991), Turssi et al. (2010), Yassen et al. (2011), Laurance-Young et al. (2011), apresentam características que os tornam substitutos do substrato humano em modelos *in situ* de erosão/abrasão dental. Essas características incluem: composição mais uniforme que os dentes humanos, o que diminui a variabilidade de respostas, dureza, orientação dos prismas de esmalte e porcentagem em peso de cálcio equivalentes ao esmalte dental humano. Possuem

também maior área de superfície e serem de fácil obtenção em relação aos dentes humanos. Diferenças morfológicas entre ambos os substratos podem ser encontradas (maior porosidade e maiores cristais de hidroxiapatita) e implicam em maior taxa de progressão de desmineralização do substrato bovino em relação ao substrato humano (Amaechi et al., 1999a; Vieira et al., 2005; Attin et al., 2007). Segundo Zero (1995), essas diferenças entre substratos resultam em diferença de comportamento durante modelo experimentais cariogênico *in situ*. Apesar da leve ciclagem erosiva realizada no presente estudo (aproximadamente 5 µm), os resultados apresentados podem ser sobrestimados quando comparados com os dentes humanos *in vivo. C*omo o presente estudo foi capaz de se aproximar mais das variáveis biológicas do ambiente oral, os resultados devem ser entendidos como um indicador do que possivelmente ocorreria *in vivo* (Rios et al., 2006a).

Outra variável experimental em modelos *in situ*, como já abordado anteriormente, é a presença da película salivar sobre as amostras de esmalte dental que é a principal condição biológica relacionada à erosão dental. Fatores salivares muito discutidos no contexto da cárie dental devem ser especialmente considerados na erosão dental. A película salivar pode atuar como um doador de cálcio e fosfato para processos de remineralização ou pode auxiliar na precipitação de uma camada mineral sobre a superfície do dente, protegendo-a do contato direto com substâncias ácidas (Lendenmann et al., 2000; Buzalaf et al., 2012). A escolha por 2 h para formação da película salivar foi baseada em resultados de estudos anteriores (Meurman; Frank, 1991; Amaechi et al., 1999c; Lendenmann et al., 2000; Hannig et al., 2003; Hannig et al., 2004; Hara et al., 2006a; Wiegand et al., 2008a) que mostraram que uma película com 02 horas de formação já tem capacidade de proteger a superfície do esmalte, reduzindo o efeito dos ácidos. Películas adquiridas salivares formadas *in situ* por 30 min, 1 hora e 2 horas (Hannig et al., 2004) ou 2, 6, 12 e 24 horas (Hannig et al., 2003), respectivamente, não diferiram significativamente na habilidade em reduzir a desmineralização do esmalte em desafios erosivos (Wiegand et al., 2008a).

É importante ressaltar que a discussão dos resultados deste estudo é limitada pela pouca literatura existente sobre os efeitos do laser de CO_2 com comprimento de onda de 9,3-9,6 µm na prevenção e/ou controle das lesões de erosão dental. Além disso, os diferentes agentes fluoretados, os diferentes parâmetros de irradiação com laser de CO_2 e os diferentes modelos experimentais utilizados nos estudos de

erosão dental tornam inadequadas as comparações precisas entre a literatura e os dados aqui encontrados.

Dentro das limitações desse estudo *in situ*, pode-se concluir que o uso do enxaguatório bucal fluoretado contendo estanho (500 ppm F^-, 800 ppm Sn^{2+}, pH = 4,5) mostrou potencial de controle da erosão de esmalte dental. A irradiação do esmalte dental com o laser associado à solução fluoretada mostrou-se eficaz, mas seu efeito não foi sinérgico. O laser de CO_2 (9,6 µm), nos parâmetros utilizados, não foi capaz de controlar a erosão em esmalte causada por ácido cítrico. No entanto, o laser de CO_2 é uma tecnologia promissora para o controle dos processos de desmineralização erosiva do esmalte, já demonstrando potencial *in vivo* para prevenção de lesões de cárie dental. Portanto, estudos futuros são necessários para determinar o parâmetro ideal do emprego clínico do laser de CO_2 (9,3 - 9,6 µm) para prevenção da erosão dental.

Conclusões

8 CONCLUSÕES

Considerando as condições experimentais sob as quais foi realizado este estudo *in situ,* pode-se concluir que:

- a solução de AmF/NaF/$SnCl_2$ (contendo 500 ppm F^-, 800 ppm Sn^{2+}, pH = 4,5) foi o tratamento que apresentou melhor potencial de prevenção da erosão de esmalte dental.
- o laser de CO_2, nos parâmetros utilizados, não foi capaz de controlar lesão de erosão em esmalte causada por ácido cítrico (0,65%, pH 3,6);
- o tratamento da superfície do esmalte dental com a solução de AmF/NaF/$SnCl_2$, associado à irradiação com o laser CO_2, mostrou-se eficaz, mas seu efeito não foi sinérgico.

Referências

REFERÊNCIAS[1]

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

Amaechi BT, Higham SM. Eroded enamel lesion remineralization by saliva as a possible factor in the site-specificity of human dental erosion. Arch Oral Biol. 2001a Aug;46(8):697-703.

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

Amaechi BT, Higham SM. Dental erosion: possible approaches to prevention and control. J Dent. 2005 Mar;33(3):243-52.

Amaechi BT, Higham SM, Edgar WM. Factors influencing the development of dental erosion in vitro: enamel type, temperature and exposure time. J Oral Rehabilit. 1999a Aug;26(8):624-30.

Amaechi BT, Higham SM, Edgar WM. The use of gamma irradiation for the sterilization of enamel for intra-oral cariogenicity tests. J Oral Rehabilit. 1999b Oct;26(10):809-13.

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

Apel C, Meister J, Gotz H, Duschner H, Gutknecht N. Structural changes in human dental enamel after subablative erbium laser irradiation and its potential use for caries prevention. Caries Res. 2005 Jan-Feb;39(1):65-70.

Attin T, Knofel S, Buchalla W, Tutuncu R. In situ evaluation of different remineralization periods to decrease brushing abrasion of demineralized enamel. Caries Res. 2001 May-Jun;35(3):216-22.

[1] De acordo com estilo Vancouver

Attin T, Wegehaupt F, Gries D, Wiegand A. The potential of deciduous and permanent bovine enamel as substitute for deciduous and permanent human enamel: Erosion-abrasion experiments. J Dent. 2007 Oct;35(10):773-7.

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

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

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

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

Blankenau RJ, Powell G, Ellis RW, Westerman GH. In vivo caries-like lesion prevention with argon laser: pilot study. J Clin Laser Med Surg. 1999 Dec;17(6):241-3.

Bruun C, Givskov H. Formation of CaF_2 on sound enamel and in caries-like enamel lesions after different forms of fluoride applications in vitro. Caries Res. 1991;25(2):96-100.

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

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

Carvalho TS, Bönecker M, Altenburger MJ, Buzalaf MAR, Sampaio FC, Lussi A. Fluoride varnishes containing calcium glycerophosphate: fluoride uptake and the effect on in vitro enamel erosions. Clin Oral Invest. 2015 Jul;19(6):1429-36.

Cavadini C, Siega-Riz AM, Popkin BM. US adolescent food intake trends from 1965 to 1996. Arch Dis Child. 2000 Jul;83(1):18-24.

Chan KH, Tom H, Darling CL, Fried D. A method for monitoring enamel erosion using laser irradiated surfaces and optical coherence tomography. Lasers Surg Med. 2014 Nov;46(9):672-8.

Chen CC, Huang ST. The effects of lasers and fluoride on the acid resistance of decalcified human enamel. Photomed Laser Surg. 2009 Jun;27(3):447-52.

Chin-Ying SH, Xiaoli G, Jisheng P, Wefel JS. Effects of CO_2 laser on fluoride uptake in enamel. J Dent. 2004 Feb;32(2):161-7.

Cohen J, Featherstone JD, Le CQ, Steinberg D, Feuerstein O. Effects of CO_2 laser irradiation on tooth enamel coated with biofilm. Lasers Surg Med. 2014 Mar;46(3):216-23.

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

El Aidi H, Bronkhorst EM, Huysmans MC, Truin GJ. Dynamics of tooth erosion in adolescents: a 3-year longitudinal study. J Dent. 2010 Feb;38(2):131-7.

Ericsson Y, Hardwick L. Individual diagnosis, prognosis and counselling for caries prevention. Caries Res. 1978;12 Suppl 1:94-102.

Esteves-Oliveira M, Pasaporti C, Heussen N, Eduardo CP, Lampert F, Apel C. Rehardening of acid-softened enamel and prevention of enamel softening through CO_2 laser irradiation. J Dent. 2011 Jun;39(6):414-21.

Esteves-Oliveira M, Yu H, de Paula Eduardo C, Meister J, Lampert F, Attin T, Wiegand A. Screening of CO_2 laser (10.6 µm) parameters for prevention of enamel erosion. Photomed Laser Surg. 2012 Jun;30(6):331-8.

Esteves-Oliveira M, Zezell DM, Meister J, Franzen R, Stanzel S, Lampert F, Eduardo CP, Apel C. CO_2 Laser (10.6 microm) parameters for caries prevention in dental enamel. Caries Res. 2009;43(4):261-8.

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

Featherstone JD. Prevention and reversal of dental caries: role of low level fluoride. Community Dent Oral Epidemiol. 1999 Feb;27(1):31-40.

Featherstone JD. Caries detection and prevention with laser energy. Dent Clin North Am. 2000 Oct;44(4):955-69, ix.

Featherstone JD, Barrett-Vespone NA, Fried D, Kantorowitz Z, Seka W. CO_2 laser inhibitor of artificial caries-like lesion progression in dental enamel. J Dent Res. 1998 Jun;77(6):1397-403.

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

Featherstone JD, Nelson DG. Laser effects on dental hard tissues. Adv Dent Res. 1987 Oct;1(1):21-6.

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

Fowler BO, Kuroda S. Changes in heated and in laser-irradiated human tooth enamel and their probable effects on solubility. Calcif Tissue Int. 1986 Apr;38(4):197-208.

Fowler CE, Gracia L, Edwards MI, Willson R, Brown A, Rees GD. Inhibition of enamel erosion and promotion of lesion rehardening by fluoride: a white light interferometry and microindentation study. J Clin Dent. 2009;20(6):178-85.

Fox JL, Yu D, Otsuka M, Higuchi WI, Wong J, Powell G. Combined effects of laser irradiation and chemical inhibitors on the dissolution of dental enamel. Caries Res. 1992a;26(5):333-9.

Fox JL, Yu D, Otsuka M, Higuchi WI, Wong J, Powell GL. Initial dissolution rate studies on dental enamel after CO_2 laser irradiation. J Dent Res. 1992b Jul;71(7):1389-98.

Fried D, Featherstone JD, Le CQ, Fan K. Dissolution studies of bovine dental enamel surfaces modified by high-speed scanning ablation with a lambda = 9.3-microm TEA CO_2 laser. Lasers Surg Med. 2006 Oct;38(9):837-45.

Fried D, Glena RE, Featherstone JD, Seka W. Permanent and transient changes in the reflectance of CO_2 laser-irradiated dental hard tissues at lambda = 9.3, 9.6, 10.3, and 10.6 microns and at fluences of 1-20 J/cm^2. Lasers Surg Med. 1997;20(1):22-31.

Fried D, Ragadio J, Champion A. Residual heat deposition in dental enamel during IR laser ablation at 2.79, 2.94, 9.6, and 10.6 microm. Lasers Surg Med. 2001;29(3):221-9.

Fried D, Zuerlein MJ, Le CQ, Featherstone JD. Thermal and chemical modification of dentin by 9-11-microm CO_2 laser pulses of 5-100-micros duration. Lasers Surg Med. 2002;31(4):275-82.

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

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

Ganss C, Klimek J, Schwarz N. A comparative profilometric in vitro study of the susceptibility of polished and natural human enamel and dentine surfaces to erosive demineralization. Arch Oral Biol. 2000 Oct;45(10):897-902.

Ganss C, Lussi A. Diagnosis of erosive tooth wear. Monogr Oral Sci. 2006;20:32-43.

Ganss C, Lussi A, Grunau O, Klimek J, Schlueter N. Conventional and anti-erosion fluoride toothpastes: effect on enamel erosion and erosion-abrasion. Caries Res. 2011;45(6):581-9.

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

Ganss C, Schlueter N, Friedrich D, Klimek J. Efficacy of waiting periods and topical fluoride treatment on toothbrush abrasion of eroded enamel in situ. Caries Res. 2007a;41(2):146-51.

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

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

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

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

Gregg T, Mace S, West NX, Addy M. A study in vitro of the abrasive effect of the tongue on enamel and dentine softened by acid erosion. Caries Res. 2004 Nov-Dec;38(6):557-60.

Hall AF, Buchanan CA, Millett DT, Creanor SL, Strang R, Foye RH. The effect of saliva on enamel and dentine erosion. J Dent. 1999 Jul;27(5):333-9.

Hannig C, Hamkens A, Becker K, Attin R, Attin T. Erosive effects of different acids on bovine enamel: release of calcium and phosphate in vitro. Arch Oral Biol. 2005a Jun;50(6):541-52.

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

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

Hannig M, Balz M. Protective properties of salivary pellicles from two different intraoral sites on enamel erosion. Caries Res. 2001 Mar-Apr;35(2):142-148.

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

Hannig M, Hess NJ, Hoth-Hannig W, De Vrese M. Influence of salivary pellicle formation time on enamel demineralization--an in situ pilot study. Clin Oral Investig. 2003 Sep;7(3):158-161.

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

Hara AT, Kelly SA, Gonzalez-Cabezas C, Eckert GJ, Barlow AP, Mason SC, Zero DT. Influence of fluoride availability of dentifrices on eroded enamel remineralization in situ. Caries Res. 2009;43(1):57-63.

Hara AT, Lussi A, Zero DT. Biological factors. Monogr Oral Sci. 2006b;20:88-99.

Hara AT, Queiroz CS, Paes Leme AF, Serra MC, Cury JA. Caries progression and inhibition in human and bovine root dentine in situ. Caries Res. 2003 Sep-Oct;37(5):339-44.

Harazaki M, Hayakawa K, Fukui T, Isshiki Y, Powell LG. The Nd-YAG laser is useful in prevention of dental caries during orthodontic treatment. Bull Tokyo Dent Coll. 2001 May;42(2):79-86.

Hellwig E, Lussi A, Goetz F. Influence of human saliva on the development of artificial erosions. Caries Res. 2013;47(6):553-8.

Hermont AP, Oliveira PA, Martins CC, Paiva SM, Pordeus IA, Auad SM. Tooth erosion and eating disorders: a systematic review and meta-analysis. PloS one. 2014;9(11):e111123.

Hjortsjo C, Jonski G, Thrane PS, Saxegaard E, Young A. The effects of acidic fluoride solutions on early enamel erosion in vivo. Caries Res. 2009;43(2):126-31.

Honorio HM, Rios D, Santos CF, Magalhaes AC, Buzalaf MA, Machado MA. Effects of erosive, cariogenic or combined erosive/cariogenic challenges on human enamel: an in situ/ex vivo study. Caries Res. 2008;42(6):454-9.

Hooper S, West NX, Pickles MJ, Joiner A, Newcombe RG, Addy M. Investigation of erosion and abrasion on enamel and dentine: a model in situ using toothpastes of different abrasivity. J Clin Periodontol. 2003 Sep;30(9):802-8.

Hossain M, Nakamura Y, Kimura Y, Ito M, Yamada Y, Matsumoto K. Acquired acid resistance of dental hard tissues by CO_2 laser irradiation. J Clin Laser Med Surg. 1999 Oct;17(5):223-6.

Hossain MM, Hossain M, Kimura Y, Kinoshita J, Yamada Y, Matsumoto K. Acquired acid resistance of enamel and dentin by CO_2 laser irradiation with sodium fluoride solution. J Clin Laser Med Surg. 2002 Apr;20(2):77-82.

Hove L, Holme B, Ogaard B, Willumsen T, Tveit AB. The protective effect of TiF_4, SnF_2 and NaF on erosion of enamel by hydrochloric acid in vitro measured by white light interferometry. Caries Red. 2006;40(5):440-3.

Hove LH, Holme B, Young A, Tveit AB. The erosion-inhibiting effect of TiF_4, SnF_2, and NaF solutions on pellicle-covered enamel in vitro. Acta Odontol Scand. 2007 Oct;65(5):259-64.

Hove LH, Holme B, Young A, Tveit AB. The protective effect of TiF_4, SnF_2 and NaF against erosion-like lesions in situ. Caries Res. 2008;42(1):68-72.

Hove LH, KR Stenhagen, B Holme and AB Tveit. The protective effect of SnF_2 containing toothpastes and solution on enamel surfaces subjected to erosion and abrasion in situ. Eur Arch Paediatr Dent. 2014 Aug;15(4):237-43.

Hsu CY, Jordan TH, Dederich DN, Wefel JS. Effects of low-energy CO_2 laser irradiation and the organic matrix on inhibition of enamel demineralization. J Dent Res. 2000 Sep;79(9):1725-30.

Hsu CY, Jordan TH, Dederich DN, Wefel JS. Laser-matrix-fluoride effects on enamel demineralization. J Dent Res. 2001 Sep;80(9):1797-801.

Hsu J, Fox JL, Wang Z, Powell GL, Otsuka M, Higuchi WI. Combined effects of laser irradiation/solution fluoride ion on enamel demineralization. J Clin Laser Med Surg. 1998 Apr;16(2):93-105.

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

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

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

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

Kantorowitz Z, Featherstone JD, Fried D. Caries prevention by CO_2 laser treatment: dependency on the number of pulses used. J Am Dent Assoc. 1998 May;129(5):585-91.

Kitasako Y, Sasaki Y, Takagaki T, Sadr A, Tagami J. Age-specific prevalence of erosive tooth wear by acidic diet and gastroesophageal reflux in Japan. J Dent. 2015 Apr;43(4):418-23.

Klein AL, Rodrigues LK, Eduardo CP, Nobre dos Santos M, Cury JA. Caries inhibition around composite restorations by pulsed carbon dioxide laser application. Eur J Oral Sci. 2005 Jun;113(3):239-44.

Kuroda S, Fowler BO. Compositional, structural, and phase changes in in vitro laser-irradiated human tooth enamel. Calcif Tissue Int. 1984 Jul;36(4):361-9.

Lagerweij MD, Buchalla W, Kohnke S, Becker K, Lennon AM, Attin T. Prevention of erosion and abrasion by a high fluoride concentration gel applied at high frequencies. Caries Res. 2006;40(2):148-53.

Larsen MJ. Prevention by means of fluoride of enamel erosion as caused by soft drinks and orange juice. Caries Res. 2001 May-Jun;35(3):229-34.

Larsen MJ, Richards A. Fluoride is unable to reduce dental erosion from soft drinks. Caries Res. 2002 Jan-Feb;36(1):75-80.

Laurance-Young P, Bozec L, Gracia L, Rees G, Lippert F, Lynch RJ, Knowles JC. A review of the structure of human and bovine dental hard tissues and their physicochemical behaviour in relation to erosive challenge and remineralisation. J Dent. 2011 Apr;39(4):266-72.

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

Lepri TP, Colucci V, Turssi CP, Corona SA. Permeability of eroded enamel following application of different fluoride gels and CO_2 laser. Lasers Med Sci. 2013 Jan;28(1):235-40.

Lepri TP, Colucci V, Turssi CP, Corona SA. In situ investigation of the effect of TiF_4 and CO_2 laser irradiation on the permeability of eroded enamel. Arch Oral Biol. 2015 Jun;60(6):941-7.

Lepri, TP, Scatolin RS, Colucci V, De Alexandria AK, Maia LC, Turssi CP, Corona SA. In Situ analysis of CO_2 laser irradiation on controlling progression of erosive lesions on dental enamel. Microsc Res Tech. 2014 Aug;77(8):586-93.

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

Levy FM, Magalhaes AC, Gomes MF, Comar LP, Rios D, MA Buzalaf. The erosion and abrasion-inhibiting effect of TiF(4) and NaF varnishes and solutions on enamel in vitro. Int J Paediatr Dent. 2012 Jan;22(1):11-6.

Levy FM, Rios D, Buzalaf MA, Magalhaes AC. Efficacy of TiF_4 and NaF varnish and solution: a randomized in situ study on enamel erosive-abrasive wear. Clin Oral Investig. 2014 May;18(4):1097-102.

Lussi, A. Dental erosion clinical diagnosis and case history taking. Eur J Oral Sci. 1996 Apr;104(2 (Pt 2):191-8.

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

Lussi A, Jaeggi T. Erosion--diagnosis and risk factors. Clin Oral Investig. 2008 Mar;12 Suppl 1:S5-13.

Lussi A, Jaeggi T, Gerber C, Megert B. Effect of amine/sodium fluoride rinsing on toothbrush abrasion of softened enamel in situ. Caries Res. 2004a Nov-Dec;38(6):567-71.

Lussi A, Jaeggi T, Jaeggi-Scharer S. Prediction of the erosive potential of some beverages. Caries Res. 1995;29(5):349-54.

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

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

Lussi A, Megert B, Eggenberger D, Jaeggi T. Impact of different toothpastes on the prevention of erosion. Caries Res. 2008;42(1):62-7.

Lussi A, Schaffner M. Progression of and risk factors for dental erosion and wedge-shaped defects over a 6-year period. Caries Res. 2000 Mar-Apr;34(2):182-7.

Lussi A, Schlueter N, Rakhmatullina E, Ganss C. Dental erosion--an overview with emphasis on chemical and histopathological aspects. Caries Res. 2011;45 Suppl 1:2-12.

Lussi A, Strub M, Schurch E, Schaffner M, Burgin W, Jaeggi T. Erosive tooth wear and wedge-shaped defects in 1996 and 2006: cross- sectional surveys of Swiss army recruits. Swiss Dent J. 2015;125(1):13-27.

Macdonald E, North A, Maggio B, Sufi F, Mason S, Moore C, Addy M, West NX. Clinical study investigating abrasive effects of three toothpastes and water in an in situ model. J Dent. 2010 Jun;38(6):509-16.

Magalhaes AC, Rios D, Martinhon CC, Delbem AC, Buzalaf MA, Machado MA. The influence of residual salivary fluoride from dentifrice on enamel erosion: an in situ study. Braz Oral Res. 2008 Jan-Mar;22(1):67-71.

Magalhaes AC, Stancari FH, Rios D, Buzalaf MA. Effect of an experimental 4% titanium tetrafluoride varnish on dental erosion by a soft drink. J Dent. 2007 Nov;35(11):858-61.

Magalhaes AC, Wiegand A, Rios D, Buzalaf MA, Lussi A. Fluoride in dental erosion. Monogr Oral Sci. 2011;22:158-70.

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

Mangueira DF, Sampaio FC, Oliveira AF. Association between socioeconomic factors and dental erosion in Brazilian schoolchildren. J Public Health Dent. 2009 Fall;69(4):254-9.

Mantonanaki M, Koletsi-Kounari H, Mamai-Homata E, Papaioannou W. Dental erosion prevalence and associated risk indicators among preschool children in Athens, Greece. Clin Oral Investig. 2013 Mar;17(2):585-93.

Mathew A, Reddy NV, Sugumaran DK, Peter J, Shameer M, Dauravu LM. Acquired acid resistance of human enamel treated with laser (Er:YAG laser and CO_2 laser) and acidulated phosphate fluoride treatment: An in vitro atomic emission spectrometry analysis. Contemp Clin Dent. 2013 Apr;4(2):170-5.

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

McCormack SM, Fried D, Featherstone JD, Glena RE, Seka W. Scanning electron microscope observations of CO_2 laser effects on dental enamel. J Dent Res. 1995 Oct;74(10):1702-8.

Meurman JH, Frank RM. Scanning electron microscopic study of the effect of salivary pellicle on enamel erosion. Caries Res. 1991;25(1):1-6.

Meurman JH, Hemmerle J, Voegel JC, Rauhamaa-Makinen R, Luomanen M. Transformation of hydroxyapatite to fluorapatite by irradiation with high-energy CO_2 laser. Caries Res. 1997;31(5):397-400.

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

Meyer-Lueckel H, Umland N, Hopfenmuller W, Kielbassa AM. Effect of mucin alone and in combination with various dentifrices on in vitro Remineralization. Caries Res. 2004 Sep-Oct;38(5):478-83.

Moshonov J, Stabholz A, Bar-Hilel R, Peretz B. Chemical analysis and surface morphology of enamel and dentin following 9.6µm CO_2 laser irradiation versus high speed drilling. J Dent. 2005 May;33(5):427-32.

Murakami C, Oliveira LB, Sheiham A, Nahas Pires Correa MS, Haddad AE, Bonecker M. Risk indicators for erosive tooth wear in Brazilian preschool children. Caries Res. 2011;45(2):121-9.

Nascimento S, Frazao P, Bousquat A, Antunes JL. Dental health in Brazilian adults between 1986 and 2010. Rev Saude Publica. 2013 Dec;47 Suppl 3:69-77.

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

Nelson DG, Jongebloed WL, Featherstone JD. Laser irradiation of human dental enamel and dentine. N Z Dent J. 1986a Jul;82(369):74-7.

Nelson DG, Shariati M, Glena R, Shields CP, Featherstone JD. Effect of pulsed low energy infrared laser irradiation on artificial caries-like lesion formation. Caries Res. 1986b;20(4):289-99.

Nelson DG, Wefel JS, Jongebloed WL, Featherstone JD. Morphology, histology and crystallography of human dental enamel treated with pulsed low-energy infrared laser radiation. Caries Res. 1987;21(5):411-26.

Nelson KG, Bainbridge CA. $SnHPO_4$ from the reaction of stannous fluoride and hydroxyapatite at a low pH. J Dent Res. 1973 Mar-Apr;52(2):318-21.

Nunn JH. Prevalence of dental erosion and the implications for oral health. Eur J Oral Sci. 1996 Apr;104(2 (Pt 2):156-61.

Nunn JH, Gordon PH, Morris AJ, Pine CM, Walker A. Dental erosion -- changing prevalence? A review of British National childrens' surveys. Int J Paediatr Dent. 2003 Mar;13(2):98-105.

Oho T, Morioka T. A possible mechanism of acquired acid resistance of human dental enamel by laser irradiation. Caries Res. 1990;24(2):86-92.

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

Peres KG, Armenio MF, Peres MA, Traebert J, De Lacerda JT. Dental erosion in 12-year-old schoolchildren: a cross-sectional study in Southern Brazil. Int J Paediatr Dent. 2005 Jul;15(4):249-55.

Rakhmatullina E, Beyeler B, Lussi A. Inhibition of enamel erosion by stannous and fluoride containing rinsing solutions. Schweiz Monatsschr Zahnmed. 2013;123(3):192-8.

Ramalho KM, Eduardo C de P, Heussen N, Rocha RG, Lampert F, Apel C, Esteves-Oliveira M. Protective effect of CO_2 laser (10.6 µm) and fluoride on enamel erosion in vitro. Lasers Med Sci. 2013 Jan;28(1):71-8.

Ramos-Oliveira TM, Ramos TM, Esteves-Oliveira M, Apel C, Fischer H, Eduardo C de P, Steagall W, Freitas, PM. Potential of CO_2 lasers (10.6 µm) associated with fluorides in inhibiting human enamel erosion. Braz Oral Res. 2014 Jan-Feb;28(1):1-6.

Raucci-Neto W, de Castro-Raucci LM, Lepri CP, Faraoni-Romano JJ, Gomes da Silva JM, Palma-Dibb RG. Nd:YAG laser in occlusal caries prevention of primary teeth: a randomized clinical trial. Lasers Med Sci. 2015 Feb;30(2):761-8.

Rechmann P, Charland DA, Rechmann BM, Le CQ, JD Featherstone. In-vivo occlusal caries prevention by pulsed CO_2 -laser and fluoride varnish treatment--a clinical pilot study. Lasers Surg Med. 2013 Jul;45(5):302-10.

Rechmann P, Fried D, CQ Le CQ, G Nelson G, Rapozo-Hilo M, Rechmann BM, Featherstone JD. Caries inhibition in vital teeth using 9.6-µm CO2-laser irradiation. J Biomed Opt. 2011 Jul;16(7):071405.

Ren YF, Liu X, Fadel N, Malmstrom H, Barnes V, Xu T. Preventive effects of dentifrice containing 5000ppm fluoride against dental erosion in situ. J Dent. 2011 Oct;39(10):672-8.

Rios D, Honorio HM, Magalhaes AC, Buzalaf MA, Palma-Dibb RG, Machado MA, da Silva SM. Influence of toothbrushing on enamel softening and abrasive wear of eroded bovine enamel: an in situ study. Braz Oral Res. 2006a Apr-Jun;20(2):148-54.

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

Rios D, Magalhães AC, Polo RO, Wiegand A, Attin T, Buzalaf MA. The efficacy of a highly concentrated fluoride dentifrice on bovine enamel subjected to erosion and abrasion. J Am Dent Assoc. 2008 Dec;139(12):1652-6.

Robinson C, Hallsworth AS, Shore RC, Kirkham J. Effect of surface zone deproteinisation on the access of mineral ions into subsurface carious lesions of human enamel. Caries Res. 1990;24(4):226-30.

Rodrigues LK, Nobre Dos Santos M, Featherstone JD. In situ mineral loss inhibition by CO_2 laser and fluoride. J Dent Res. 2006 Jul;85(7):617-21.

Rodrigues LK, Nobre dos Santos M, Pereira D, Assaf AV, Pardi V. Carbon dioxide laser in dental caries prevention. J Dent. 2004 Sep;32(7):531-40.

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

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

Scheutzel P. Etiology of dental erosion--intrinsic factors. Eur J Oral Sci. 1996 Apr;104(2 (Pt 2):178-90.

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

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

Schlueter N, Hara A, Shellis RP, Ganss C. Methods for the measurement and characterization of erosion in enamel and dentine. Caries Res. 2011a;45 Suppl 1:13-23.

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

Schlueter N, Klimek J, Ganss C. Effect of stannous and fluoride concentration in a mouth rinse on erosive tissue loss in enamel in vitro. Arch Oral Biol. 2009c May;54(5):432-6.

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

Schlueter N, Klimek J, Ganss C. In vitro efficacy of experimental tin- and fluoride-containing mouth rinses as anti-erosive agents in enamel. J Dent. 2009e Dec;37(12):944-8.

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

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

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

Seka W, Fried D, Featherstone JD, Borzillary SF. Light deposition in dental hard tissue and simulated thermal response. J Dent Res. 1995 Apr;74(4):1086-92.

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

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

Silva CV. Influência da frequência de aplicação da solução de AmF/NaF/$SnCl_2$ no seu potencial em inibir a progressão da lesão de erosão no esmalte dental humano [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2-15.

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

Sobral, MA, Lachowski KM, de Rossi W, Braga SR, Ramalho KM. Effect of Nd:YAG laser and acidulated phosphate fluoride on bovine and human enamel submitted to erosion/abrasion or erosion only: an in vitro preliminary study. Photomed Laser Surg. 2009 Oct;27(5):709-713.

Sorvari R, Meurman JH, Alakuijala P, Frank RM. Effect of fluoride varnish and solution on enamel erosion in vitro. Caries Res. 1994;28(4):227-32.

Souza-Gabriel AE, Colucci V, Turssi CP, Serra MC, Corona SA. Microhardness and SEM after CO_2 laser irradiation or fluoride treatment in human and bovine enamel. Microsc Res Tech. 2010 Oct;73(11):1030-5.

Steiner-Oliveira C, Nobre-dos-Santos M, Zero DT, Eckert G, Hara AT. Effect of a pulsed CO_2 laser and fluoride on the prevention of enamel and dentine erosion. Arch Oral Biology. 2010 Feb;55(2):127-33.

Steiner-Oliveira C, Rodrigues LK, Lima EB, Nobre-dos-Santos M. Effect of the CO_2 laser combined with fluoridated products on the inhibition of enamel demineralization. J Contemp Dent Pract. 2008;9(2):113-21.

Steiner-Oliveira C, Rodrigues LK, Soares LE, Martin AA, Zezell DM, Nobre-dos-Santos M. Chemical, morphological and thermal effects of 10.6-microm CO_2 laser on the inhibition of enamel demineralization. Dent Mater J. 2006 Sep;25(3):455-62.

Stern RH, Vahl J, Sognnaes RF. Lased enamel: ultrastructural observations of pulsed carbon dioxide laser effects. J Dent Res. 1972 Mar-Apr;51(2):455-60.

Tagliaferro EP, Rodrigues LK, Nobre Dos Santos M, Soares LE, Martin AA. Combined effects of carbon dioxide laser and fluoride on demineralized primary enamel: an in vitro study. Caries Res. 2007;41(1):74-6.

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

Tepper SA, Zehnder M, Pajarola GF, Schmidlin PR. Increased fluoride uptake and acid resistance by CO_2 laser-irradiation through topically applied fluoride on human enamel in vitro. J Dent. 2004 Nov;32(8):635-41.

Turssi CP, Hara AT, Amaral FL, Franca FM, Basting RT. Calcium lactate pre-rinse increased fluoride protection against enamel erosion in a randomized controlled in situ trial. J Dent. 2014 May;42(5):534-9.

Turssi CP, Maeda FA, Messias DC, Neto FC, Serra MC, Galafassi D. Effect of potential remineralizing agents on acid softened enamel. Am J Dent. 2011 Jun;24(3):165-8.

Turssi CP, Messias DF, Corona SM, Serra MC. Viability of using enamel and dentin from bovine origin as a substitute for human counterparts in an intraoral erosion model. Braz Dent J. 2010;21(4):332-6.

van Rijkom H, Ruben J, Vieira A, Huysmans MC, Truin GJ, Mulder J. Erosion-inhibiting effect of sodium fluoride and titanium tetrafluoride treatment in vitro. Eur J Oral Sci. 2003 Jun;111(3):253-7.

Vargas-Ferreira F, Praetzel JR, Ardenghi TM. Prevalence of tooth erosion and associated factors in 11-14-year-old Brazilian schoolchildren. J Public Health Dent. 2011 Winter;71(1):6-12.

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

Vlacic J, Meyers IA, Walsh LJ. Laser-activated fluoride treatment of enamel as prevention against erosion. Austr Dent J. 2007 Sep;52(3):175-80.

Voronets J, Lussi A. Thickness of softened human enamel removed by toothbrush abrasion: an in vitro study. Clin Oral Investig. 2010 Jun;14(3):251-6.

Wang X, Lussi A. Assessment and management of dental erosion. Dent Clin North Am. 2010 Jul;54(3):565-78.

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

Wegehaupt FJ, Taubock TT, Stillhard A, Schmidlin PR, Attin T. Influence of extra- and intra-oral application of CPP-ACP and fluoride on re-hardening of eroded enamel. Acta Odontol Scand. 2012 May;70(3):177-83.

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

Wei SH, WC Forbes. Electron microprobe investigations of stannous fluoride reactions with enamel surfaces. Journal of dental research. 1974 Jan-Feb;53(1):51-56.

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

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

Wetton S, Hughes J, West N, Addy M. Exposure time of enamel and dentine to saliva for protection against erosion: a study in vitro. Caries Res. 2006;40(3):213-17.

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

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

Wiegand A, Bliggenstorfer S, Magalhaes AC, Sener B, Attin T. Impact of the in situ formed salivary pellicle on enamel and dentine erosion induced by different acids. Acta Odontol Scand. 2008a Aug;66(4):225-30.

Wiegand A, Hiestand B, Sener B, Magalhaes AC, Roos M, Attin T. Effect of TiF_4, ZrF_4, HfF_4 and AmF on erosion and erosion/abrasion of enamel and dentin in situ. Arch Oral Biol. 2010a Mar;55(3):223-8.

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

Wiegand A, Meier W, Sutter E, Magalhaes AC, Becker K, Roos M, Attin T. Protective effect of different tetrafluorides on erosion of pellicle-free and pellicle-covered enamel and dentine. Caries Res. 2008b;42(4):247-54.

Yassen GH, Platt JA, Hara AT. Bovine teeth as substitute for human teeth in dental research: a review of literature. J Oral Sci. 2011 Sep;53(3):273-82.

Yokoyama K, Kimura Y, Matsumoto K, Fujishima A, Miyazaki T. Preventive effect of tooth fracture by pulsed Nd:YAG laser irradiation with diamine silver fluoride solution. J Clin Laser Med Surg. 2001 Dec;19(6):315-8.

Young A, Thrane PS, Saxegaard E, Jonski G, Rolla G. Effect of stannous fluoride toothpaste on erosion-like lesions: an in vivo study. Eur J Oral Sci. 2006 Jun;114(3):180-3.

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

Yu H, Attin T, Wiegand A, Buchalla W. Effects of various fluoride solutions on enamel erosion in vitro. Caries Res. 2010a;44(4):390-401.

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

Zach L, Cohen G. Pulp response to externally applied heat. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1965 Apr;19:515-30.

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

Zebrauskas A, Birskute R, Maciulskiene V. Prevalence of Dental Erosion among the Young Regular Swimmers in Kaunas, Lithuania. J Oral Maxillofac Res. 2014 Apr;5(2):e6.

Zero DT. In situ caries models. Adv Dent Res. 1995 Nov;9(3):214-30; discussion 231-4.

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

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

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

Zezell DM, Boari HG, Ana PA, Eduardo C de P, Powell G. L. Nd:YAG laser in caries prevention: a clinical trial. Lasers Surg Med. 2009 Jan;41(1):31-5.

Zuerlein MJ, Fried D, Featherstone JD. Modeling the modification depth of carbon dioxide laser-treated dental enamel. Lasers Surg Med. 1999;25(4):335-47.

Apêndices

APÊNDICE A – Instruções aos Voluntários

INSTRUÇÕES AOS VOLUNTÁRIOS

- A fase experimental *in situ* terá duração de 20 dias. O aparelho deverá ser utilizado durante 2 fases pré-determinadas de 4 dias cada, visto que antes de cada fase, haverá um período de preparo/descanso de 2 dias, em que o aparelho não será utilizado;

- O aparelho deverá ser utilizado aproximadamente das 7h ± 30 min às 19h ± 30 min, devendo ser armazenado na caixa sobre a gaze umedecida com água destilada-deionizada (que foi fornecida no kit da pesquisa) em geladeira durante a noite;

- Para evitar a formação de biofilme, ao final de cada dia experimental, imergir seu aparelho por 1 minuto em solução de clorexidina 0,12%, fornecido no kit da pesquisa; após a imersão enxaguar o aparelho em água corrente e armazená-lo na geladeira;

- Antes de qualquer refeição e/ou lanche e/ou ingestão de bebidas, remova o aparelho da boca e coloque-o na caixa sobre a gaze umedecida com água destilada-deionizada;

- Após a ingestão de alimentos e bebidas (exceto água) entre as refeições principais, enxágue a boca com água corrente e aguarde 15 minutos antes de colocar novamente o aparelho na boca;

- Você pode beber APENAS ÁGUA com o aparelho em boca;

- Realize a higienização dos dentes naturais normalmente 3x/dia (após café da manhã, almoço e antes de dormir) com a escova de dente, creme dental e fio dental fornecidos pela pesquisadora;

- A porção interna do aparelho, que fica em contato com a mandíbula, poderá ser escovada com a mesma escova de dente e creme dental fornecidos no kit de higiene oral diária.

- Não escove a superfície que contém os fragmentos de esmalte dental, e evite também, que o dentifrício entre em contato com as amostras;

- Durante o experimento, interrompa o uso de qualquer enxaguatório bucal;

- Durante o experimento, você não deverá fazer uso de qualquer medicação sistêmica;

- Durante as 2 fases experimentais de 4 dias (de 26 a 29/05/2014 e de 09 a 12/06/2014) você deverá realizar devidamente os procedimentos instruídos;

- Nas sextas-feiras (dia 30/06 e 13/06) ou em outro dia previamente combinado, os aparelhos deverão ser entregues a mim, para recolhimento das amostras e as análises em laboratório;

- Na quarta-feira (dia 04/06) ou quinta-feira (dia 05/06) você deverá comparecer na FOUSP para recebimento de novo kit de pesquisa (aparelho contendo novas amostras e potes contendo novo ácido cítrico para a fase experimental seguinte);

- Caso você tenha algum desconforto durante o experimento, me comunique imediatamente pelo telefone: (79)9978-3281 (Vivo) ou pelo email: thayannemramos@usp.br;

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

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

APÊNDICE B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Você está sendo convidado(a) como voluntário(a) a participar da pesquisa: **"Avaliação *in situ* do efeito do laser de CO_2 na prevenção da lesão de erosão em esmalte dental bovino**", a ser realizada pela aluna do curso de Doutorado em Dentística Thayanne Monteiro Ramos Oliveira, sob orientação da Profa. Dra. Patrícia Moreira de Freitas, no Laboratório Especial de Laser em Odontologia (LELO) do Departamento de Dentística da Faculdade de Odontologia da USP (FOUSP). As informações contidas neste formulário têm objetivo de firmar acordo escrito mediante o qual você - o voluntário da pesquisa - autoriza a sua participação na pesquisa, com pleno conhecimento da natureza dos procedimentos a que se submeterá, com capacidade de livre-arbítrio e sem qualquer coação.

Objetivo: Este estudo *in situ* tem como objetivo avaliar se o laser de CO_2 pode prevenir a lesão de erosão em esmalte dental bovino.

Justificativa: Apesar de estudos terem demonstrado resultados promissores dos lasers de CO_2, 9,6 e 10,6 µm na prevenção de lesões de cárie, até o momento, não existem relatos na literatura da ação do laser de CO_2 (9,6 µm) na prevenção de lesões erosão esmalte dental. Desta forma, justifica-se uma avaliação *in situ* do efeito de novas alternativas de tratamentos do esmalte dental.

Procedimentos: Os voluntários selecionados terão a sua arcada dental inferior moldada para a confecção de um aparelho removível mandibular, confeccionado em resina acrílica. Cada dispositivo conterá 8 fragmentos de esmalte bovino (devidamente esterilizado em radiações gama no IPEN/USP). Dois dias antes do início do experimento e durante todo o experimento, você, voluntário da pesquisa, deverá utilizar exclusivamente a escova de dente, o creme dental e o fio dental fornecidos pela pesquisadora.

O experimento total irá durar 20 dias: 2 dias iniciais de preparação (período *lead-in*) e 2 fases experimentais de 4 dias de utilização do dispositivo mandibular. Entre as fases experimentais haverá períodos de *wash-out* de 10 dias, nos quais você, voluntário da pesquisa, NÃO utilizará o aparelho intra-oral. Durante ouso do aparelho, as amostras submetidas, *in vitro*, aos diferentes tratamentos propostos na pesquisa, serão submetidas à erosão extra-oral *in situ*.

Para a erosão: você irá adaptar o aparelho em boca pela manhã (aproximadamente 7h ± 30 min) e após 02 horas, você irá imergir o aparelho nos frascos fornecidos pela pesquisadora contendo ácido cítrico 0,65% (pH 3,6) por 4 minutos, 2 vezes ao dia, durante 04 dias e em horários pré-determinados. Após a imersão, o aparelho será seco cuidadosamente em papel absorvente e reinserido na boca, até a próxima imersão. Cada imersão deverá ser feita em um novo ácido, devendo o anterior ser devolvido à pesquisadora.Você continuará higienizando seus dentes normalmente com pasta de dente com flúor. Em uma das fases da pesquisa (previamente informada pela pesquisadora), você irá bochechar 10 mL de solução fluoretada (Elmex Erosion®) por 30 segundos. Este bochecho deverá ser realizado 1x/dia, durante os 04 dias da fase experimental, após a primeira escovação dental diária e com os dispositivos mandibulares em boca.

Riscos e Desconforto: Os voluntários poderão sentir um leve desconforto pelo uso do aparelho removível, que será minimizado com o ajuste criterioso do dispositivo.

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

Forma de acompanhamento e assistência: Todos os procedimentos serão acompanhados pela pesquisadora. Além disso, ela oferecerá toda a assistência necessária durante a pesquisa, se o voluntário tiver qualquer problema com o uso do dispositivo intra-oral.

Garantia de Sigilo da identidade do sujeito da pesquisa: A pesquisadora irá tratar a sua identidade com padrões profissionais de sigilo. As informações fornecidas e o material que indique a sua participação serão confidenciais e de conhecimento apenas das pesquisadoras responsáveis. Nada será liberado sem a sua permissão. Você não será identificado(a) em nenhuma publicação que possa resultar deste estudo. Uma cópia deste consentimento informado será arquivada no Departamento de Dentística da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo e outra será fornecida a você.

Garantia de esclarecimentos, Liberdade de Recusa: Você será esclarecido(a) sobre a pesquisa em qualquer aspecto que desejar. A sua participação é voluntária e você é livre para recusar-se a participar, retirar seu consentimento ou interromper a participação a qualquer momento, sem nenhuma penalidade e sem prejuízos.

Custos da Participação, Ressarcimento ou indenização: A participação no estudo não acarretará custos para você e não será disponível nenhuma compensação financeira adicional. Você será ressarcido(a) de eventuais despesas com transporte para comparecimento na FOUSP para realização dos procedimentos laboratoriais. Não há indenização prevista, pois a presente pesquisa não oferece qualquer dano ao indivíduo.

Qualquer dúvida ou problema relativo à pesquisa deve ser comunicado com a maior brevidade possível à Thayanne Monteiro através do telefone (79) 9978-3281 (Vivo) ou pelo email thayannemramos@usp.br. Se houver dúvidas sobre a ética da pesquisa (Parecer 206.317 de 22/02/2013) entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia (Av. Lineu Prestes 2227, 05508-000 São Paulo, telefone (11)3091-7960 ou pelo e-mail cepfo@usp.br).

Após ter sido informado e ter minhas dúvidas suficientemente esclarecidas pela pesquisadora, declaro que concordo em participar de forma voluntária desta pesquisa. Recebi uma cópia deste termo de consentimento livre e esclarecido e me foi dada a oportunidade de ler e esclarecer as minhas dúvidas.

_____

Local e Data

Nome do Participante	Assinatura	RG ou CPF
Pesquisadora Responsável	Assinatura	CRO/SP
Orientadora	Assinatura	CRO/SP

Anexos

Anexo A – Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa (página 1)

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DA UNIVERSIDADE DE SÃO

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação in situ do efeito do laser de CO_2, associado ou não ao flúor, na inibição da progressão da lesão de erosão em esmalte dental bovino.

Pesquisador: Thayanne Monteiro Ramos Oliveira

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 11799413.2.0000.0075

Instituição Proponente: FUNDACAO PARA O DESENVOLVIMENTO CIENT E TEC ODONTOLOGIA

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 206.317

Data da Relatoria: 22/02/2013

Apresentação do Projeto:

Durante muitos anos a Odontologia atuou de forma a amenizar a agressividade das lesões erosivas. Definida como uma dissolução patológica do esmalte dental, causada por agentes quelantes ou ácidos de origem não bacteriana, a erosão dental tem sido rotineiramente diagnosticada, principalmente, em virtude do aumento do consumo de alimentos ácidos pela população e também do crescente relato de transtornos alimentares e gastroesofágicos. No entanto, estratégias como mudanças de hábitos alimentares e de higiene dental, estimulação salivar, otimização dos regimes de flúor, restaurações e identificação de fatores de risco, ainda não são capazes de impedir o surgimento da erosão dental.

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar se a irradiação do esmalte dental bovino com o laser de CO_2, associado ou não ao flúor, pode proteger o substrato erodido de futuros episódios ácidos.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Apesar dos riscos relatados, estes são plenamente justificados pelos possíveis benefícios da pesquisa. Além disso, cesa haja qualquer desconforto, o voluntário pode abandonar a pesquisa sem qualquer ônus.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A Pesquisa é interessante e dentro das normas éticas esperadas.

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 05.508-900
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3091-7960 **Fax:** (11)3091-7814 **E-mail:** cepfo@usp.br

Anexo A – Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa (página 2)

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DA UNIVERSIDADE DE SÃO

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:
O TCLE apresentado está de acordo com as normas do CEP FOUSP.

Recomendações:
Não Há.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:
Aprovado.
Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados ao CEP-FOUSP relatórios parciais anuais referentes ao andamento da pesquisa e relatório final ao término do trabalho. Qualquer modificação do projeto original deve ser apresentada a este CEP, de forma objetiva e com justificativas, para nova apreciação.

Situação do Parecer:
Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:
Não

Considerações Finais a critério do CEP:
Projeto de pesquisa adequado para aprovação do CEP-FOUSP.

SAO PAULO, 26 de Fevereiro de 2013

Assinador por:
Marcia Turolla Wanderley
(Coordenador)

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 05.508-900
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3091-7960 **Fax:** (11)3091-7914 **E-mail:** cepfo@usp.br

ANEXO B – Certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA
Tel. (11) 3091 7887/7863

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo CEUA/FOUSP **Nº 005/2014** referente ao projeto intitulado: "**Avaliação in situ do efeito do laser de CO_2, associado ou não ao flúor, na inibição da progressão da lesão de erosão em esmalte dental bovino**" sob a responsabilidade de execução dos autores Profa. Dra. **Patricia Moreira de Freitas Costa e Silva**, o(a) aluno(a) **Thayanne Monteiro Ramos Oliveira**, foi analisado na presente data e considerado isento de análise da CEUA por utilizar dentes bovinos provenientes de frigoríficos.

São Paulo, 28 de abril de 2014.

Prof. Dr. João Gualberto de Cerqueira Luz
Presidente da CEUA/FOUSP