Taísa Penazzo Lepri

**Análise *in situ* do efeito do laser de CO₂ no controle da progressão de
lesões de erosão e abrasão no esmalte dental**

Tese apresentada à Faculdade de
Odontologia de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo, para obtenção
do título de Doutor em Ciências – Programa:
Odontologia Restauradora.

Área de Concentração: Odontologia
Restauradora (Opção: Dentística)

Orientadora: Profa. Dra. Silmara Aparecida Milori Corona

Ribeirão Preto

2014

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.

Catálogo da Publicação

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Tratamento da Informação do Serviço de Biblioteca

Lepri, Taísa Penazzo

Análise *in situ* do efeito do laser de CO₂ no controle da progressão de lesões de erosão e abrasão no esmalte dental. Ribeirão Preto, 2014.
68p. : il.; 30cm

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Odontologia Restauradora – Opção: Dentística.

Orientadora: Profa. Dra. Silmara Aparecida Milori Corona.

1. Esmalte Dental. 2. Erosão. 3. Abrasão. 4. Laser de CO₂

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: LEPRI, Taísa Penazzo

Título: Análise *in situ* do efeito do laser de CO₂ no controle da progressão de lesões de erosão e abrasão no esmalte dental

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências – Programa: Odontologia Restauradora.

Área de Concentração: Odontologia Restauradora (Opção: Dentística)

Banca Examinadora

Data da Defesa: __/__/__

Profa. Dra. Silmara Aparecida Milori Corona

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: _____

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Emílio César Lepri (*in memoriam*) e Leila Maria Penazzo Lepri. Exemplos de honestidade, trabalho, respeito e caráter; nunca mediram esforços em proporcionar sempre o melhor a seus filhos.

“Dedique-se a conhecer seus pais.

É impossível prever quando eles terão ido embora, de vez.”

Traduzido de “Wear Sunscreen” – Mary Schmich

Aos meus irmãos, Lígia, Cesar e Edgar. Pelo companheirismo e amizade em todos os momentos da minha vida.

“Seja legal com seus irmãos.

Eles são a melhor ponte com o seu passado

e possivelmente quem vai sempre te apoiar no futuro.”

Traduzido de “Wear Sunscreen” – Mary Schmich

À minha sobrinha e afilhada Heloísa, que com sua alegria, seu carinho e sua inteligência, desperta em mim um tipo de amor e de saudade que eu não sabia existir.

Ao meu noivo, Glauco Lemes Fernandes, por me apoiar em todas as minhas decisões, mesmo quando eu escolho o caminho mais longo por acreditar que a recompensa será maior. Pelo amor, carinho, companheirismo, amizade e paciência dedicados a mim.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A Deus, pelo dom da vida, por iluminar meu caminho, dando-me paz e serenidade.

À minha orientadora, Profa. Dra. Silmara Aparecida Milori Corona, por ter depositado em mim a confiança para trabalharmos juntas, desde minha graduação. Pela paciência, disposição e bom humor com os quais você sempre conduz nossos trabalhos.

À Profa. Dra. Cecília Pedroso Turssi, pela seriedade e competência com que executa seu trabalho. Agradeço a preciosa ajuda no delineamento e correção dos artigos científicos e, em especial, ao tratamento dos dados estatísticos deste estudo.

À Profa. Lucianne Cople Maia e à doutoranda Adílis Kalina de Alexandria, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, pela paciência e dedicação que possibilitaram que as análises de perfilometria óptica fossem realizadas naquela instituição.

À Renata Siqueira Scatolin, a quem tanto recorri durante o doutorado, seja para assuntos acadêmicos ou pessoais. Tendo sido pedra fundamental no desenvolvimento desta pesquisa, agradeço muito por sua dedicação e empenho.

À amiga Maily Rehder Wimmers Ferreira, pela amizade criada e cultivada desde nossa graduação. Por ter estado ao meu lado nos momentos em que mais precisei, tanto pessoal como profissionalmente, e por podermos compartilhar vários momentos da pós-graduação.

AGRADECIMENTOS

À Universidade de São Paulo, representada pelo Magnífico Reitor Marco Antonio Zago.

À Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, representada pelo Digníssimo Diretor Prof. Dr. Valdemar Mallet da Rocha Barros e pela Vice-Diretora Profa. Dra. Léa Assed Bezerra da Silva.

À Coordenação Geral da Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, na pessoa do Prof. Dr. Arthur Belém Novaes Júnior.

À Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Odontologia Restauradora da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, na pessoa do Prof. Dr. Manoel Damião de Sousa Neto.

Ao Chefe do Departamento de Odontologia Restauradora da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, na pessoa do Prof. Dr. Ricardo Gariba Silva.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pela concessão da bolsa de doutorado e pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

Às Profas. Dras. Mônica Campos Serra e Regina Guenka Palma-Dibb, docentes da Área de Dentística do Programa da Pós-Graduação em Odontologia Restauradora da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, pela expressiva contribuição para o meu desenvolvimento científico-acadêmico.

A todos os Professores do Departamento de Odontologia Restauradora da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

Aos amigos e orientados da Profa. Silmara, Ana Bárbara, Renata, Silvana, Mariana e Rodrigo pela amizade e pelas trocas de conhecimentos indispensáveis para o crescimento de uma equipe.

Às colegas da turma de Doutorado em Dentística, Juliana e Carmen.

Às colegas de pós-graduação em Odontopediatria, Camila, Marília, Késsia, Mariana e Silvana.

A todos os colegas do Laboratório de Dentística, que em algum momento de minha formação acadêmica, contribuíram para o meu crescimento como pesquisadora.

Aos voluntários, sem os quais a realização deste trabalho *in situ* não teria sido possível.

Ao Carlos, secretário do Curso de Pós-Graduação em Odontologia Restauradora da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

À técnica Patrícia Marchi, do Laboratório de Pesquisa em Dentística da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

À Isabel e Regiane, secretárias da Seção de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

À Amália e Maria Isabel, secretárias do Departamento de Odontologia Restauradora da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

À Luiza e Rosângela, funcionárias do Departamento de Odontologia Restauradora da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

Lepri TP. **Análise *in situ* do efeito do laser de CO₂ no controle da progressão de lesões de erosão e abrasão no esmalte dental.** 2014. Tese (Doutorado). Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

Resumo

O presente estudo, composto por 2 experimentos *in situ*, buscou avaliar o efeito da irradiação com laser de CO₂ no controle da progressão de lesões de erosão e, posteriormente, analisar a influência da abrasão em superfícies irradiadas e erodidas. No primeiro experimento, 56 fragmentos de incisivos bovinos (5x3x2.5mm) tiveram suas superfícies de esmalte divididas em 4 áreas: 1. Hígida (área de referência); 2. Erosão inicial; 3. Tratamento (irradiado ou não com laser de CO₂); 4. Após fase *in situ*. O desafio erosivo inicial foi realizado com ácido cítrico 1% (pH=2,3) por 5 minutos, 2x/dia, por 2 dias. Os espécimes foram divididos em 2 grupos de acordo com o tratamento da superfície: irradiados com laser de CO₂ ($\lambda = 10,6 \mu\text{m}$; 0,5 W) e não irradiados. Após um período de lead-in de 2 dias, 14 voluntários usaram um dispositivo intraoral palatino contendo 2 espécimes (irradiado e não irradiado), em 2 fases intraorais de 5 dias cada. Seguindo um desenho cross-over, durante a primeira fase, metade dos voluntários imergiu seu dispositivo em 100mL de ácido cítrico por 5 minutos, 3x/dia, enquanto a outra metade usou água deionizada (controle). Os voluntários foram cruzados quanto aos desafios na segunda fase. O desgaste do esmalte foi determinado quantitativamente por um perfilômetro óptico e a morfologia da superfície do esmalte foi avaliada qualitativamente por microscopia eletrônica de varredura. ANOVA a três critérios para medidas repetidas mostrou que não houve interação significativa entre desafio erosivo e irradiação com laser de CO₂ ($p=0,419$). O desafio erosivo aumentou significativamente o desgaste do esmalte ($p=0,001$), independente de ter sido realizada ou não a irradiação com laser de CO₂. Não houve diferença no desgaste do esmalte entre os espécimes irradiados e não irradiados ($p=0,513$). No segundo experimento, o preparo e seleção dos espécimes de esmalte bovino, a indução das lesões de erosão iniciais e os tratamentos foram

realizados como no primeiro experimento. Após um período de 2 dias de lead-in, 12 voluntários usaram um dispositivo palatino contendo dois espécimes irradiados e dois não irradiados, em duas fases intraorais de 5 dias cada. Seguindo um protocolo split-mouth, os voluntários imergiram extraoralmente, durante 5 minutos, os dispositivos em ácido cítrico 3x/dia por 5 dias. Uma hora após cada desafio erosivo, um espécime irradiado e um não irradiado foram escovados usando uma escova elétrica e slurry de dentífrico. As variáveis de resposta foram as mesmas empregadas no primeiro experimento. ANOVA a dois critérios revelou que não houve interação significativa entre desafio erosivo-abrasivo e irradiação com laser de CO₂ (p=0,614). A irradiação laser não influenciou no desgaste do esmalte (p=0,742). O desgaste do esmalte dos espécimes submetidos a erosão + abrasão não foi diferente daquele verificado quando a erosão foi realizada sozinha (p=0,626), independente do laser de CO₂ ter sido aplicado ou não. Pode-se concluir que, em condições intraorais, a irradiação com laser de CO₂ não controlou a progressão de lesões de erosão nem de lesões de erosivo-abrasivas no esmalte.

Palavras-chave: erosão, laser de CO₂, esmalte, abrasão

Lepri TP. ***In situ* analysis of the effect of CO₂ laser irradiation to control the progression of erosive and abrasive lesions on dental enamel.** 2014. Tese (Doutorado). Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

Abstract

This study, composed of 2 *in situ* experiments, aimed to evaluate the effect of CO₂ laser irradiation to control the progression of erosive lesions and, after, analyze the influence of abrasion on irradiated and eroded surfaces. At the first experiment, 56 slabs of bovine incisors (5x3x2.5mm) had its enamel surface divided in 4 areas: 1. Sound (reference area); 2. Initial erosion; 3. Treatment (irradiated or not with CO₂ laser); 4. After *in situ* phase. The erosive challenge was performed with 1% citric acid (pH 2.3), during 5 minutes, 2x/day, for 2 days. The specimens were divided in 2 groups according to the surface treatment: CO₂ laser irradiated ($\lambda = 10.6 \mu\text{m}$; 0.5 W) and non-irradiated. After a 2-day-lead-in period, 14 volunteers wore an intraoral palatal device containing 2 specimens (irradiated and non-irradiated), in 2 intraoral phases of 5 days each. Following a crossover design, during the first phase, half of the volunteers immersed its device on 100mL of citric acid during 5 minutes, 3x/day, while the other half immersed on deionized water (control). Volunteers were crossed on the challenges on the second phase. The enamel wear was quantitatively determined by an optical profilometer and the morphology of enamel surface was qualitatively evaluated by scanning electron microscopy. Three-way ANOVA for repeated measures showed that there was no significant interaction between erosive challenge and CO₂ laser irradiation ($p=0.419$). The erosive challenge significantly increased the enamel wear ($p=0.001$), regardless of irradiated or not with CO₂ laser. There was no difference on the enamel wear of irradiated and non-irradiated specimens ($p=0.513$). At the second experiment, preparation and selection of bovine enamel specimens, induction of initial erosive lesion and treatments were performed as already described for the first experiment. After a 2-day-lead-in period, 12 volunteers wore and intraoral palatal device containing 2 irradiated and 2 non-irradiated specimens, at two

intraoral phases of 5 days each. Following a split-mouth protocol, volunteers immersed the devices extra orally, during 5 minutes, in 1% citric acid, 3x/day for 5 days. One hour after each erosive challenge, one irradiated and one non-irradiated specimen were brushed with an electrical toothbrush and dentifrice slurry. The response variables were the same studied at the first experiment. Two-way ANOVA revealed that there was no significant interaction between erosive-abrasive challenge and CO₂ laser irradiation ($p=0.614$). The laser irradiation did not influence on the enamel wear ($p=0.742$). The enamel wear presented by the specimens subjected to erosion + abrasion did not differ from that verified when the erosion was performed alone. It can be concluded that, in intraoral conditions, the CO₂ laser irradiation did not controlled the progression of erosive lesions or erosive-abrasive lesions on enamel.

Key words: erosion, CO₂ laser, enamel, abrasion

SUMÁRIO

RESUMO	8
ABSTRACT	10
1. INTRODUÇÃO	13
2. PROPOSIÇÃO	18
3. MATERIAIS E MÉTODOS	20
3.1 Experimento 1	21
3.2 Experimento 2	30
4. RESULTADOS	37
4.1 Experimento 1	38
4.2 Experimento 2	42
5. DISCUSSÃO	46
6. CONCLUSÕES	53
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55
ANEXOS	65

1. Introdução

1. Introdução

O aumento da expectativa de vida dos pacientes associado ao declínio na perda de elementos dentais (ZERO et al., 2005) e, consequentemente, à manutenção destes na cavidade bucal por tempo prolongado, faz com que o desgaste dental seja um fenômeno cada vez mais presente no cotidiano odontológico (AMAECHI; HIGHAM, 2005).

Frente a alterações nos hábitos dietéticos da população com o aumento da quantidade e frequência do consumo de bebidas e alimentos potencialmente erosivos (LUSSI; JAEGGI; ZERO, 2004; EHLEN et al., 2008), a ocorrência de desgastes dentais patológicos (JOHANSSON; LINGSTROM; BIRKHED, 2002; ZERO e LUSSI 2005), como a erosão (LUSSI; JAEGGI, 2008; BARTLETT et al., 2011) e a abrasão tem se tornado cada vez mais importante (KREULEN et al., 2010).

Enquanto na erosão dental, o contato das superfícies dentais com ácidos de origem não-bacteriana resulta em uma perda irreversível de tecido (FEATHERSTONE; LUSSI 2006), na abrasão dental, são as forças mecânicas que causam o desgaste patológico (LEVITCH et al., 1994). A erosão dental pode ser causada por ácidos endógenos, provenientes do vômito recorrente ou regurgitação do conteúdo gástrico (BARTLETT 2006; TANTBIROJN et al., 2012) ou ácidos exógenos, como bebidas ácidas, alimentos ou medicamentos (LUSSI; JAEGGI, 2006; COCHRANE et al., 2012), sendo o consumo frequente de bebidas ácidas a maior causa desta patologia (ZERO; LUSSI, 2006).

O desenvolvimento da erosão dental envolve um processo químico, no qual o ácido causa dissolução do esmalte prismático e interprismático, a fase inorgânica do dente é desmineralizada, reduzindo, assim, a dureza do esmalte e da camada de dentina da raiz (LUSSI; JAEGGI; JAEGGI-SCHÄRER, 1995). Em fases avançadas, o ataque ácido leva a ambos os desgastes e ao amolecimento da superfície de esmalte. Dessa forma, se o desafio erosivo é contínuo, o processo de dissolução é acompanhado pelo progressivo amolecimento e perda de superfície (AMAECHI; HIGHAM 2001).

Em situações clínicas, o tecido duro dental é submetido não somente a influências erosivas, mas também abrasivas, como por exemplo, a escovação dental. O impacto mecânico da escovação no esmalte dental sadio tem efeito insignificante (ADDY; HUNTER, 2003) enquanto na erosão dental, a qual causa perda irreversível de tecido duro, acompanhada pelo amolecimento progressivo da superfície (AMAECHI; HIGHAM, 2001), a superfície dental fica mais suscetível à remoção por estas forças mecânicas (EISENBURGER; SHELLIS; ADDY, 2003) aumentando a perda de tecido dental.

Quando ambos os tipos de desgaste – erosão e abrasão – estão associados, sabe-se que a força colocada na escova durante a escovação (WIEGAND et al., 2013) e o tempo de espera entre o desafio erosivo e a escovação (JAEGGI; LUSSI, 1999) são fatores determinantes no desgaste dental, de forma que a escovação imediatamente após o desafio erosivo pode causar uma perda do esmalte superficial 5 a 6 vezes maior do que quando o desafio erosivo acontece sozinho (ATTIN et al., 2000; ATTIN et al., 2001).

Na tentativa de reduzir a incidência e prevalência de lesões abrasivas e erosivas ou minimizar a extensão do seu dano, várias estratégias têm sido propostas para minimizar a desmineralização e potencializar a remineralização do substrato dental frente a desafios ácidos (HJORTSJÖ et al., 2010; WIEGAND et al., 2010; WIEGAND et al., 2010a; LEPRI et al., 2013; STEINER-OLIVEIRA et al., 2010; ESTEVES-OLIVEIRA et al., 2012, RAMALHO et al., 2013).

Dentre as estratégias empregadas com intuito de reduzir a incidência de desmineralização das superfícies dentais encontra-se a reeducação dos pacientes com a finalidade de modificar alguns hábitos dietéticos. Quando se trata de ácidos de origem extrínseca, é ideal que se reduza a exposição às fontes ácidas através da diminuição da frequência de ingestão de alimentos e bebidas com tal característica, bem como que se minimize o tempo de contato das soluções com as superfícies dentais (LUSSI; JAEGGI; ZERO 2004). Porém, devido à restrita contribuição por parte dos pacientes em modificar seus hábitos dietéticos, a busca e a instituição de medidas preventivas que sejam

realmente capazes de prevenir e controlar a erosão e a abrasão dental se faz necessária.

Dentre as medidas preventivas que visam modular o processo de des e remineralização, observa-se o emprego dos lasers, entre os quais o de CO₂ (NELSON et al., 1987; TSAI et al., 2002), o qual pode aumentar significativamente a resistência ácida do esmalte frente a desafio ácidos (RODRIGUES; SANTOS; FEATHERSTONE, 2006; STEINER-OLIVEIRA et al., 2008), tornando-o significativamente menos solúvel aos ácidos (FEATHERSTONE et al., 1998). Entretanto, o real mecanismo de ação pelo qual este fenômeno ocorre ainda é incerto.

Tem sido afirmado que as alterações químicas e estruturais causadas na superfície de esmalte pela irradiação com laser de CO₂ são responsáveis pelo aumento da resistência ácida do esmalte (FEATHERSTONE, 2000; COHEN et al., 2014) e que a matriz de esmalte é parcialmente desnaturada e sua permeabilidade diminuída após a irradiação com laser de CO₂, dificultando a difusão do ácido por entre os poros do substrato, reduzindo a demineralização (TEPPER et al., 2004; SOUZA-GABRIEL et al., 2010, RAMALHO et al., 2013). Por meio do aquecimento da superfície dental, o laser de CO₂ causa redução do conteúdo de carbonato e a denaturação parcial da matriz orgânica (HSU et al., 2000), diminuindo a permeabilidade, dificultando a difusão dos ácidos e reduzindo a desmineralização da estrutura dental (GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ et al., 2011).

Na cavidade bucal, fatores como a presença de saliva podem interferir no desenvolvimento e na progressão das lesões de erosão (HARA et al., 2006). Além da saliva, a presença da película adquirida (CHEAIB; LUSSI, 2011; HARA et al., 2006) e a capacidade tampão da saliva (AMAECHI; HIGHAM, 2001) são mecanismos fisiológicos que atuam sobre as superfícies dentais expostas aos ácidos e interferem no processo de des e remineralização.

No contexto da erosão dental, já foi demonstrado que o laser de CO₂ pode reduzir a perda mineral de esmalte em estudos *in vitro* (ESTEVES-OLIVEIRA et al., 2012; RAMALHO et al., 2013) e *in situ* quando associado a diferentes fluoretos (WIEGAND et al., 2010). Entretanto, nenhum destes

estudos empregou o laser de CO₂ sozinho para controlar a progressão do desgaste do esmalte dental previamente erodido.

Assim, observa-se a necessidade de se avaliar o efeito do laser de CO₂ no controle da progressão de lesões de erosão e erosão + abrasão, através de um modelo *in situ*, uma vez que este representa um estágio intermediário entre estudos *in vitro* e estudos clínicos (WIEGAND; ATTIN, 2011; SHELLIS et al., 2011). A maior vantagem deste tipo de modelo experimental é a possibilidade de interação do substrato testado com a saliva presente no ambiente oral ao mesmo tempo em que se obtém o controle das variáveis experimentais (ZERO, 1995).

2. Proposição

2. Proposição

O presente estudo, composto por dois experimentos *in situ*, teve o objetivo de avaliar:

1) O efeito do laser de CO₂ no controle da progressão de lesões de erosão no esmalte dental, através de perfilometria óptica 3D e microscopia eletrônica de varredura.

2) A influência da abrasão nas superfícies erodidas, previamente irradiadas ou não com laser de CO₂, através da perfilometria óptica 3D e microscopia eletrônica de varredura.

3. Materiais e Métodos

3. Materiais e métodos

3.1 EXPERIMENTO 1

Delineamento experimental

Este estudo *in situ* foi delineado como um crossover de duas fases. Cada fase durou 5 dias com um período de washout de 15 dias entre elas. Os fatores avaliados foram Desafio Erosivo em dois níveis (A. ácido cítrico a 1% ph 2,3 e B. água deionizada – controle) e Irradiação com laser de CO₂ em dois níveis (I. presente e II. ausente).

A amostra do experimento foi composta por 56 fragmentos de esmalte bovino aleatoriamente distribuídos entre 14 voluntários, considerados blocos estatísticos (n=14). Estes voluntários usaram espécimes irradiados ou não, em fases alternadas e independentes, submetendo-os a desafio erosivo ou à água deionizada (controle)

A variável de resposta foi obtida através da análise quantitativa do desgaste por meio de perfilometria óptica 3D. O desgaste foi medido qualitativamente pelas análises de microscopia eletrônica de varredura (MEV) em 3 espécimes de cada grupo, selecionados de forma aleatória.

O delineamento experimental está esquematizado no fluxograma (Figura 1).

Figura 1. A. Remoção da raiz dos incisivos bovinos; B. Secção das coroas; C. Dois fragmentos de esmalte (5x3x2,5mm); D. Planificação e polimento; E. Medidas iniciais de microdureza (baseline); F. Delimitação da primeira área de referência (não erodida) 1,5x3mm; G. Desafios erosivos iniciais (formação das lesões de erosão); H. Armazenagem a 37° C; I. Delimitação da segunda área de referência (50% do espécime coberto); J. Irradiação com laser de CO₂; K. Delimitação da terceira área de referência (75% do espécime coberto); L. Montagem dos espécimes no dispositivo palatino; M. Desafios erosivos alternados - fase *in situ*; N. Remoção da delimitação das áreas de referência; O. Análise da perfilometria óptica 3D; P. Análise da microscopia eletrônica de varredura.

Seleção dos voluntários e aspectos éticos

Catorze voluntários com idades entre 22 e 40 anos, que se enquadravam nos critérios de inclusão (fluxo salivar normal, nenhuma evidência de atividade de cárie e lesões não cariosas, e disposição para seguir o calendário da pesquisa) sem violar os critérios de exclusão (uso de qualquer forma de medicamento que pudesse interferir na secreção de saliva, uso de aparelhos ortodônticos fixos ou removíveis, estar grávida ou amamentando, doenças gerais/sistêmicas) foram selecionados.

Os procedimentos experimentais empregados foram realizados com consentimentos livres e esclarecidos dos voluntários, seguindo protocolos revisados e aprovados pelo Comitê de Ética da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Brasil (CAAE 02110512.2.0000.5419).

Cada voluntário teve sua arcada superior moldada com alginato (Jeltrate Tipo II, Dentsply Indústria e Comércio Ltda., Petrópolis, RJ, Brasil) usando uma moldeira de estoque. O molde foi vazado em gesso pedra, e um dispositivo palatino removível foi confeccionado em resina acrílica (Jet, Artigos Odontológicos Clássico Ltda., São Paulo, SP, Brasil). Os dispositivos possuíam duas caixas retentivas (7x7x3mm), uma de cada lado da linha mediana, as quais acomodaram dois espécimes voltados para a cavidade oral.

Preparo dos fragmentos de esmalte

Incisivos bovinos recém-extraídos armazenados em solução de timol a 0,1% a 4°C foram limpos com uma cureta e slurry de água e pedra pomes em taças profiláticas e então examinados em estereomicroscópio com aumento de 20x (Leica S6 D Stereozoom, Mycrosystems Leica AG, Suíça). Os dentes que apresentaram trincas ou hipoplasia foram descartados. As raízes foram removidas 2mm abaixo da junção cimento-esmalte usando uma cortadeira de precisão refrigerada a água (Isomet 1000; Buehler, Lake Bluff, IL, EUA). Logo após, as coroas foram seccionadas, proporcionando 2 fragmentos de esmalte por dente (5x3x2,5mm).

Os fragmentos foram planificados e polidos em uma politriz refrigerada a água (Phoenix β, Buehler, Lake Bluff, IL, EUA) com a ajuda de um aparato que padroniza o procedimento. Primeiramente, os fragmentos de esmalte foram fixados em uma matriz de teflon com a ajuda de um paralelômetro (ElQuip, São Carlos, São Paulo, Brasil) para planificar a parede pulpar, com lixas d'água #600 (Norton Abrasivos Ltda, SP, Brasil) aplicadas por 20 segundos com força padronizada de 20N. Depois de planificada a parede pulpar, os espécimes foram removidos da matriz e novamente fixados, desta vez para planificar e polir a superfície de esmalte, com lixas d'água em granulação decrescente (#600 e #1200) (Norton Abrasivos Ltda, SP, Brasil) com força padronizada de 20N por 20 segundos e logo após, com suspensão de alumina 0,3 µm (Buehler, Lake Bluff, IL, USA) com força padronizada de 20N por 60 segundos.

Seleção dos espécimes

Antes da formação das lesões de erosão, os espécimes foram esterilizados pela irradiação de microondas (VIANA et al., 2010). Após a esterilização, os espécimes com trincas foram descartados.

Os espécimes foram então testados para microdureza Knoop (KHN) (HNV-2000, Shimadzu Corporation, Japão) por meio de 3 identações no centro do espécime, distantes 100 µm uma das outras, com força de 25g por 5 segundos (MAGALHÃES et al., 2007). A média das três leituras foi usada com o valor de microdureza de cada espécime. Os espécimes com valores de microdureza 10% acima ou abaixo da média ($300 \pm 10\%$) foram excluídos, restando 56 espécimes, que foram cobertos com esmalte de unha ácido resistente (Colorama, Maybelline, Brasil) em três camadas, exceto na superfície vestibular, que permaneceu descoberta.

A superfície dos espécimes foi dividida em 4 áreas distintas: 1. Hígida, 2. Erosão inicial, 3. Tratamento (irradiado ou não com laser de CO₂) e 4. Erosão final (após fase *in situ*), como representado na Figura 2.

A região hígida foi considerada com área de referência de cada espécime (aproximadamente 1,25mm x 3 mm). A primeira área (1) foi coberta

com resina composta, aplicada em uma superfície não condicionada com ácido e na ausência de sistema adesivo.

Figura 2 – Espécimes de esmalte esquematizados: 1 – área hígida (controle); erosão inicial; 3 – tratamento (irradiado ou não); 4 – após fase *in situ*.

Formação das lesões de erosão

Para criar lesões de erosão iniciais, os espécimes foram submetidos a desafios erosivos duas vezes ao dia (às 9h e às 13h) por dois dias. Cada desafio consistia na imersão individual de cada espécime em 20mL de ácido cítrico 1% (pH 2,3), em um frasco Erlenmeyer, o qual foi posicionado em uma máquina de agitação (CT155, Cientec, Piracicaba, SP, Brasil) com velocidade de agitação de 100rpm durante 5 minutos (AMAECHI et al., 1999).

Após cada desafio erosivo, os espécimes foram enxaguados por 10 segundos em água deionizada e armazenados em 10 mL de saliva artificial a 37 °C durante as 4h de intervalo entre os desafios erosivos assim como durante a noite.

A saliva artificial (pH 7,0), a qual foi trocada antes do primeiro desafio de cada dia, foi similar àquela descrita por MCKNIGHT-HANES e WHITFORD

(1992) e modificada por AMAECHI et al., 1999. Ela era composta de metil-p-hidroxibenzoato (2,0g), carboximetilcelulose (10,0g), KCl (0,625g), $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0,059 g), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,166 g), K_2HPO_4 (0,804 g); e KH_2PO_4 (0,326 g) em 1000 mL de solução aquosa.

Tratamento superficial

Após a formação das lesões de erosão iniciais, a área delimitada 2 (Figura 2) do espécime também foi protegida com resina composta sem condicionamento ou aplicação de sistema adesivo. Os espécimes erodidos foram aleatoriamente divididos em 2 grupos, de acordo com a irradiação com laser de CO_2 : I – presente e II – ausente.

Os espécimes foram irradiados com PC015-A (Shangai Jue Hua Laser Tech, Development Co. Ltd, Shangai, China) no modo ultrapulso e não contato.

A irradiação foi realizada desfocada 4mm distante da superfície de esmalte (TEPPER et al., 2004) com a ajuda de um dispositivo que segura a caneta durante a irradiação, a qual se move de acordo com comandos previamente estabelecidos em um computador conectado à máquina de escaneamento (MPC ElQuip, São Carlos, SP, Brasil), permitindo que a irradiação alcance toda a área uniformemente. Cada espécime foi irradiado durante 10s, com tempo serviço de 100 μs e tempo ocioso de 0,001 segundos.

O conjunto de parâmetros empregados foi: 10,6 μm , 0,5W, potência média de saída 0,44W, energia de pulso 0,05mJ e densidade de energia de 0,04J/cm².

Após a realização dos tratamentos superficiais, usando o mesmo protocolo já descrito, uma camada de resina composta foi posicionada na área 3 para proteger esta superfície dos desafios erosivos subsequentes, aos quais somente a área 4 foi exposta (Figura 2).

Montagem dos espécimes nos dispositivos intra-orais

Os voluntários usaram espécimes tratados com laser de CO₂ e não irradiados em ambas as fases experimentais, mudando o desafio realizado (ácido cítrico ou água deionizada – controle) em cada fase.

Dois espécimes – um irradiado e um não irradiado – foram posicionados em cada dispositivo. A fixação dos espécimes foi feita com cera, 1mm abaixo da borda do dispositivo palatino, para evitar abrasão pelo contato com a superfície da língua.

Desafios erosivos in situ

Durante um período de lead-in de 2 dias e durante toda as fases experimentais, os voluntários foram instruídos a escovar seus dentes somente com a pasta de dentes Colgate Máxima Proteção Anticárie, Colgate-Palmolive, Divisão da Kolynos do Brasil Ltda., Osasco, SP, Brasil) e a escova de dentes (Colgate Extra Clean, Colgate-Palmolive, Divisão da Kolynos do Brasil Ltda., Osasco, SP, Brasil) fornecidas pelos pesquisadores.

Estes desafios começaram apenas no segundo dia de uso do dispositivo intraoral para permitir a formação da película adquirida (HUYSMANS et al., 2011). Um período de washout de 15 dias foi estabelecido entre as duas fases.

Na primeira fase, metade dos voluntários imergiu seu dispositivo oral em 100 mL de ácido cítrico (pH 2,3), fora da boca, durante 5 minutos, três vezes ao dia, durante um período de 4 dias. Após o desafio, os espécimes foram enxaguados por 20 segundos em água corrente e reinseridos na boca. A outra metade dos voluntários seguiu a mesma sequência, entretanto, empregaram água deionizada ao invés de ácido cítrico.

Em ambas as fases experimentais, o uso dos dispositivos foi contínuo, inclusive durante a noite, com exceção dos horários de refeição, consumo de bebidas e procedimentos de higiene oral (SCATOLIN; GALO; CORONA, 2012). Para evitar a desidratação dos espécimes durante estes períodos, o dispositivo era coberto com gaze umedecida.

Para controlar o biofilme na superfície dos espécimes, ao final de cada dia do experimento, era aplicada uma gota de clorexidina 0,2% (Bioquanti Farmácia de Maipulação, Ribeirão Preto, SP, Brasil) em cada um dos fragmentos, por um minuto, e enxaguados com água corrente, de acordo com o protocolo descrito por WEST et al., 1998.

Perfilometria óptica 3D não-contato

Ao final do experimento *in situ*, toda a resina composta foi removida, e os espécimes tiveram suas 4 áreas expostas (Figura 2): hígida (controle), erosão inicial, tratamento (irradiado ou não irradiado) e após a fase *in situ*.

A determinação das mudanças topográficas foi feita com a ajuda de um perfilômetro óptico 3D não-contato (PS50 Optical Profilometer, Nanovea, Irvine, CA, EUA). Este dispositivo permitiu um escaneamento sobre uma área de 4mm de extensão (eixo x) por 1,5m de largura (eixo y). As medições de captação foram feitas por um sensor confocal cromático com uma fonte axial de luz branca, velocidade de 2mm/s e índice de refração de 10.000.

A técnica de perfilometria óptica 3D não-contato foi usada para determinar perda de estrutura dental – profundidade de erosão (PE). A PE foi calculada a partir da altura dos degraus (em μm). Três medidas lineares foram feitas envolvendo as seguintes áreas: 1) entre a área hígida e a área de erosão inicial; 2) entre a área hígida e a área com tratamento superficial; e 3) entre a área hígida e a área após fase *in situ*. Todas as medidas foram feitas em triplicatas, calculando então seus valores médios.

Análise de microscopia eletrônica de varredura

Após a análise de perfilometria, 3 espécimes de cada grupo foram aleatoriamente selecionados (n=3) para serem avaliados por microscopia eletrônica de varredura. Os espécimes foram armazenados em frascos

Eppendorff com água deionizada e limpos em ultrassom (Ultrasonic Cleaner, Odontobras, Ribeirão Preto, SP, Brasil) por 10 minutos

Os espécimes foram então imersos em solução de glutaraldeído 2,5% tamponada com 0,1M de cacodilato de sódio (Merck KGaA, Darmstadt, D-64293, Alemanha) por 12 horas a 4°C. Após a fixação, os espécimes foram lavados em água deionizada por 3 minutos, imersos em água deionizada por 1 hora, trocando a água a cada 20 minutos.

Subsequentemente, os espécimes foram desidratados com aumentos dos percentuais de etanol (Labsynth Ltda., Diadema, SP, Brasil): 25% (20 minutos), 50% (20 minutos), 75% (20 minutos), 95% (30 minutos) e 100% (60 minutos), e secos em papel absorvente. Logo após, os espécimes foram fixados em stubs com fita de carbono dupla face (3M, São Paulo, SP, Brasil), cobertos com 30 nm de uma camada de ouro-platina (Bal-Tec SCD 005, Zurich, Suíça) em um aparato a vácuo (SDC 050, Balzers, Liechtenstein).

Os espécimes foram examinados com um microscópio eletrônico de varredura (JEOL JSM model 5410; Jeol Technic, Tokyo, Japão). Inicialmente, os espécimes foram analisados em uma visão panorâmica, e em seguida, foram feitas fotomicrografias das áreas mais representativas de cada grupo com aumento padronizado de 3000x.

Análise estatística

Os dados obtidos por meio da perfilometria óptica foram analisados através da análise de variância a três critérios para medidas repetidas, avaliando os efeitos das variáveis independentes *Irradiação com Laser de CO₂*, *Desafio Erosivo* e *Voluntários* e suas interações com a perda de superfície (variável dependente). Foi determinado nível de significância de 5% e os cálculos estatísticos foram realizados utilizando o programa SPSS 20 (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA).

3.2 EXPERIMENTO 2

Delineamento experimental

O segundo estudo *in situ* caracterizou um delineamento split-mouth de duas fases. Cada fase durou 5 dias com um período de washout de 15 dias entre elas. Os fatores avaliados foram Desgaste do esmalte em dois níveis (A. erosão e B. erosão + abrasão) e Irradiação com laser de CO₂ em dois níveis (I. presente e II. ausente).

A amostra do experimento foi composta por 48 fragmentos de esmalte bovino aleatoriamente distribuídos entre 12 voluntários, considerados blocos estatísticos (n=12). Estes voluntários usaram espécimes irradiados ou não, em fases alternadas e independentes, submetendo-os a desafio erosivo ou à água deionizada (controle).

A variável de resposta foi obtida através da análise quantitativa do desgaste por meio de perfilometria óptica 3D. O desgaste foi medido qualitativamente pelas análises de microscopia eletrônica de varredura (MEV) em 3 espécimes de cada grupo, selecionados de forma aleatória.

O delineamento experimental está esquematizado no fluxograma (Figura 3).

Figura 3. A. Remoção da raiz dos incisivos bovinos; B. Secção das coroas; C. Dois fragmentos de esmalte (5x3x2,5mm); D. Planificação e polimento; E. Medidas iniciais de microdureza (baseline); F. Delimitação da primeira área de referência (não erodida) 1,5x3mm; G. Desafios erosivos iniciais (formação das lesões de erosão); H. Armazenagem a 37° C; I. Delimitação da segunda área de referência (50% do espécime coberto); J. Irradiação com laser de CO₂; K. Delimitação da terceira área de referência (75% do espécime coberto); L. Montagem dos espécimes no dispositivo palatino; M. Desafios erosivos/abrasivos - fase *in situ*; N. Remoção da delimitação das áreas de referência; O. Análise da perfilometria óptica 3D; P. Análise da microscopia eletrônica de varredura

Seleção dos voluntários e aspectos éticos

A seleção dos voluntários foi realizada da mesma forma como já descrita para o experimento 1, com a única diferença que, no experimento 2, foram selecionados 12 voluntários.

Os aspectos éticos também foram seguidos conforme descrito para o experimento 1.

Preparo dos fragmentos de esmalte.

Os incisivos bovinos recém-extraídos foram preparados para o experimento 2 da mesma forma como descrito para os incisivos do experimento 1.

Seleção dos espécimes

A seleção dos espécimes que foram empregados no Experimento 2 foi realizada da mesma forma como a seleção no Experimento 1. No entanto, houve mudanças no padrão da divisão do espécime nas 4 áreas distintas, representadas na Figura 4: 1.Hígido, 2.Erosão Inicial, 3.Tratamento (irradiado ou não irradiado com laser de CO₂), e 4.Desgaste (erosão ou erosão + abrasão).

A área hígida foi considerada como área de referência em cada espécime (aproximadamente 1,25mm x 3mm). A primeira área (1) foi coberta com resina composta, sem que a superfície de esmalte tivesse sido condicionada ou recebido aplicação de sistema adesivo.

Figura 2 – Espécimes de esmalte esquematizados. 1 – área hígida (controle); 2. Erosão inicial; 3 – tratamento (irradiado ou não); 4 – desgaste (erosão ou erosão + abrasão).

Formação das lesões de erosão

Os procedimentos empregados para a formação de lesões de erosão no esmalte hígido no Experimento 2 foram os mesmos utilizados no Experimento 1.

Tratamento superficial

Após a formação das lesões de erosão, a área delimitada 2 (Figura 6) do espécime também foi coberta com resina composta sem condicionamento ácido ou aplicação do sistema adesivo. Os fragmentos de esmalte foram distribuídos aleatoriamente em 2 grupos de acordo com a irradiação laser: I. presente e II. ausente.

Os espécimes foram irradiados com o PC015-A (Shanghai Jue Hua Laser Tech. Development Co.,Ltd., Shangai, China) no modo ultrapulo e não-contato.

A irradiação com realizada desfocada 4 mm distante da superfície de esmalte (TEPPER et al., 2004) com a ajuda de um dispositivo que fixa a caneta durante a irradiação laser, o qual se move segundo comandos previamente estabelecidos em um computador conectado à máquina de escaneamento (MPC ElQuip, São Carlos, São Paulo, Brasil), permitindo que a irradiação alcance toda a área uniformemente. Cada espécime foi irradiado durante aproximadamente 10 segundo, com tempo de serviço de 100 μ s e tempo ocioso de 0,001 segundos.

Os conjunto de parâmetros empregados foi o mesmo do Experimento 1: 10,6 μ m, 0,5W, potência média de saída 0,44W, energia de pulso 0,05mJ e densidade de energia de 0,04J/cm²

Após a realização dos tratamentos superficiais, seguindo o mesmo protocolo já descrito, uma camada de resina composta foi posicionada na área 3 para proteger esta superfície dos desafios erosivos ou erosivo + abrasivo subsequentes. Dessa forma, a área 4 foi a única que recebeu todos os desafios e tratamentos, seguindo o grupo em que estava alocado.

Montagem dos espécimes nos dispositivos intraorais

Os voluntários usaram espécimes tratados com laser de CO₂ e não irradiados em ambas as fases experimentais, mudando o desafio (ácido cítrico ou controle) em cada fase.

Dois fragmentos de esmalte – um irradiado e um não irradiado – foram colocados em cada dispositivo. A fixação dos fragmentos foi feita com cera, 1mm abaixo da borda do dispositivo palatino para evitar a abrasão pelo contato da superfície da língua.

Desafios erosivos in situ

A realização dos desafios erosivos *in situ* no Experimento 2 foi feita seguindo o mesmo protocolo empregado no Experimento 1.

Desafios abrasivos

O desafio abrasivo foi realizado por meio da escovação padronizada e supervisionada dos espécimes de um dos lados do dispositivo intraoral (direito ou esquerdo), definido em um sorteio simples para cada um dos voluntários.

O espécime foi escovado extraoralmente, usando uma escova elétrica (PIZZO et al., 2010), com cerdas macias e pontas arredondadas (Oral-B Pró-Saúde Power, Procter & Gamble do Brasil, Brasil) e slurry de dentifrício fluoretado (3:1) (3g do dentifrício/10 mL de água – HOOPER et al., 2007) (Colgate Máxima Proteção Anticáries, Colgate-Palmolive, Divisão da Kolynos do Brasil Ltda., Brasil). As escovas foram fixadas em um dispositivo que permitiu o alinhamento da cabeça da escova paralela à superfície dos espécimes e padronizou a força de 1,5N aplicada durante os 30 segundos de escovação (166 oscilações) (WIEGAND et al., 2010) em cada espécime. Este procedimento foi realizado 3 vezes ao dia, em horários pré-estabelecidos (9h, 13h, 17h).

Perfilometria óptica 3D não contato

Ao final do experimento *in situ*, toda a resina composta foi removida e o espécime teve suas 4 áreas expostas: hígido (controle); erosão inicial, tratamento (irradiado ou não irradiado), desgaste (erosão ou erosão + abrasão).

A determinação das mudanças topográficas foi feita com a ajuda de um perfilômetro óptico não-contato (PS50 Optical Profilometer, Nanovea, Irvine, CA, EUA). Este dispositivo permitiu um escaneamento sobre uma área de 4mm de comprimento (eixo x) por 1,5mm de largura (eixo y). As medições de captação foram feitas por um sensor confocal cromático com uma fonte axial de luz branca, velocidade de 2mm/s e índice de refração de 10.000.

A técnica de perfilometria óptica 3D não-contato foi usada para determinar perda de estrutura dental – profundidade de erosão (PE). A PE foi calculada a partir da altura dos degraus (em μm). Três medidas lineares foram

feitas envolvendo as seguintes áreas: 1) entre a área hígida e a área de erosão inicial; 2) entre a área hígida e a área com tratamento superficial; e 3) entre a área hígida e a área após fase *in situ*. Todas as medidas foram feitas em triplicatas, calculando então seus valores médios.

Análise de microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Todos os procedimentos para o preparo dos espécimes, bem como as análises de MEV nos espécimes no Experimento 2 foram iguais aos realizados no Experimento 1.

Análise estatística

Os dados obtidos por meio da perfilometria óptica foram analisados através da análise de variância a dois critérios, avaliando os efeitos das variáveis dependentes *Irradiação com Laser de CO₂* e *Tratamento (erosão ou erosão + abrasão)*, e suas interações com a perda de superfície (variável dependente). Uma vez que não houve interação significativa, as comparações foram feitas entre os fatores em estudo principais (Irradiação e Tratamento) e por isso foi realizada as comparações nas médias gerais. Foi determinado o nível de significância de 5% e os cálculos estatísticos foram realizados utilizando o programa SPSS 20 (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA).

4. Resultados

4. Resultados

Experimento 1

A análise de variância a três critérios para medidas repetidas demonstrou que não houve interação significativa entre *Desafio erosivo* e *Aplicação do Laser de CO₂* ($p = 0,419$).

O desafio erosivo aumentou significativamente o desgaste do esmalte ($p=0,001$), independente de ter sido irradiado ou não com laser de CO₂. Não houve nenhuma diferença entre o desgaste do esmalte entre os espécimes irradiados com laser de CO₂ e aqueles que permaneceram não irradiados ($p=0,513$). O fator *Voluntário* não mostrou efeito significativo ($p=0,544$) (Tabela 1).

Por meio do teste t pareado, aplicado para a erosão x condição pós tratamento, independente do desafio que seria aplicado após a irradiação, foi notado que os substratos irradiados ($p=0,109$) e os não irradiados ($p=0,631$) não foram significativamente desgastados.

Utilizando o mesmo teste, quando comparados os espécimes submetidos ao desafio com água deionizada, notou-se que nem os espécimes irradiados ($p=0,062$) nem os não irradiados ($p=0,170$) apresentaram um desgaste significativamente aumentado em relação à erosão inicial.

Tabela 1 – Média e desvio padrão dos valores da perda do esmalte dentário (μm) de cada grupo.

Irradiação com laser de CO₂ x Desafio	Ácido Cítrico	Água deionizada
Irradiados	36,04 ($\pm 15,56$)	20,12 ($\pm 11,81$)
Não irradiados	35,99 ($\pm 17,94$)	16,38 ($\pm 4,80$)
Média geral	36,01 ($\pm 16,48$) B	18,25 ($\pm 9,05$) A

Médias gerais seguidas por letras distintas indicam diferença significativa

A Figura 5 mostra as imagens da perfilometria dos grupos experimentais, nas quais pode ser observado o desgaste do esmalte entre as diferentes áreas analisadas: área hígida e área de erosão inicial, área hígida e área de tratamento, área hígida e área após fase *in situ*.

Figure 5: Imagens de perfilometria óptica 3D: A- Irradiado com laser de CO₂ + ácido cítrico; B. Irradiado com laser de CO₂ + água deionizada; C. Não irradiado + ácido cítrico; D. Não irradiado + água deionizada.

Na Figura 6, as imagens de microscopia eletrônica de varredura de um espécime representativo de cada grupo mostram diferentes fases do experimento. Imagem A mostra a superfície de esmalte hígido (controle). A imagem de prismas de esmalte descoberto após os desafios erosivos *in vitro* pode ser vista na Imagem B. Superfície de esmalte irradiada (Imagem C) mostra algumas áreas onde o laser de CO₂ não apresentou interação com o

esmalte e área onde a irradiação do laser de CO₂ criou uma camada protetora (área circulada). As imagens que apresentam o esmalte levemente recoberto por uma camada protetora são exclusividade das superfícies irradiadas, como mostrado na Imagem E (esmalte irradiado e erodido). Imagem F, a qual representa o esmalte erodido, apresenta um aspecto similar ao ataque ácido, com uma grande exposição dos prismas de esmalte, representando um alto grau de dissolução do esmalte. O esmalte irradiado mas não erodido, apresentado na Imagem G, mostra pequenas áreas de dissolução do esmalte, preservando os prismas de esmalte. Imagem H, representativa dos espécimes que não foram nem irradiados nem erodidos *in situ*, mostra uma desmineralização do esmalte moderada, devido exclusivamente aos desafios erosivos *in vitro*.

Figura 6. Imagens de microscopia eletrônica de varredura. A. Superfície hígida (controle); B. Superfície inicialmente erodida; C. Superfície irradiada com laser de CO_2 ; D. Superfície não irradiada com laser de CO_2 ; E. Superfície irradiada e erodida na fase in situ; F. Superfície não irradiada e erodida na fase in situ; G. Superfície irradiada e não erodida na fase in situ; H. Superfície não irradiada e não erodida na fase in situ.

Experimento 2

A ANOVA para blocos casualizados indicou ausência de interação significativa entre os fatores de estudo ($p=0,614$). Também não constatou diferença significativa do desgaste nas condições em que o laser foi ou não empregado ($p=0,742$), independentemente se houve associação ou não da abrasão à erosão. O desgaste dos espécimes submetidos à erosão associada à abrasão não diferiu daquele verificado quando houve apenas a erosão ($p=0,626$), independentemente de ter sido ou não realizada a irradiação com laser (Tabela 2).

Tabela 2 – Média e desvio padrão dos valores da perda do esmalte dentário (μm) de cada grupo.

Irradiação com laser de CO_2	Tratamento		Média Geral
	Erosão	Erosão + Abrasão	
Presente	21,87 (2,91)	23,07 (4,25)	22,47 (3,61) A
Ausente	22,76 (4,95)	22,96 (3,02)	22,86 (4,01) A
Média Geral	22,31 (3,99)a	23,01 (3,61)a	_____

Média geral seguida de letras maiúsculas indica ausência de diferença significativa do desgaste nas condições onde o laser de CO_2 estava presente ou ausente. Média geral seguida de letras minúsculas indica ausência de diferença significativa do desgaste nas condições onde houve abrasão ou não à erosão.

A Figura 7 mostra as imagens da perfilometria dos grupos experimentais, nas quais pode ser observado o desgaste do esmalte entre as diferentes áreas analisadas: área hígida e área de erosão inicial, área hígida e área de tratamento, área hígida e área após fase *in situ*.

Figura 7: Imagens de perfilometria óptica 3D: A- Irradiação + erosão na fase intraoral; B- Irradiação + erosão e abrasão na fase intraoral; C. Não irradiado + erosão na fase intraoral; D. Não irradiado + erosão e abrasão na fase intraoral.

Na Figura 8, as imagens de MEV de um espécime representativo de cada grupo mostram diferentes fases do experimento. Imagem A mostra a superfície hígida do esmalte (controle). Na Imagem B, podem ser vistos os prismas de esmalte expostos após os desafios erosivos in vitro. A superfície de esmalte irradiada com laser de CO₂ apresenta-se ligeiramente recoberta por uma camada protetora, com os prismas mais agrupados e o espaço interprismático reduzido (Imagem C). Após irradiação e erosão, esta camada com potencial para proteger o esmalte está ausente e os prismas de esmalte estão expostos (Imagem E). Quando o esmalte irradiado foi submetido a ambos os desgastes, erosivos e abrasivos, a superfície de esmalte apresentou um padrão irregular ao longo da superfície, com maior exposição dos prismas de esmalte (Imagem F), representando um alto grau de dissolução do esmalte.

Na superfície de esmalte não irradiada e erodida, pode-se observar uma redução da cabeça dos prismas de esmalte (Imagem G) e, quando a abrasão foi associada a estes espécimes, houve uma desmineralização acentuada da cabeça dos prismas (Imagem H).

Figura 8: Imagens de microscopia eletrônica de varredura. A. Superfície hígida (controle); B. Superfície inicialmente erodida; C. Superfície irradiada com laser de CO₂; D. Superfície não irradiada com laser de CO₂; E. Superfície irradiada e erodida na fase in situ; F. Superfície irradiada, erodida e abrasionada na fase in situ; G. Superfície não irradiada e erodida na fase in situ; H. Superfície não irradiada, erodida e abrasionada na fase in situ.

5. Discussão

5. Discussão

Tendo em vista o aumento da incidência da erosão dental (JAEGGI; LUSSI, 2006), associado ao fato que em situações clínicas, os tecidos duros dentais são expostos não somente à erosão, mas também a influências abrasivas, tais como a escovação dental (BRANDINI et al., 2011), torna-se necessário, além da busca por medidas preventivas, tratamentos que minimizem a progressão e o dano já estabelecido no esmalte dental. O laser de CO₂ produz radiação na região do espectro infravermelho muito próximo das bandas de absorção de apatita (FEATHERSTONE; NELSON, 1987; FEATHERSTONE et al., 1998; NELSON et al., 1987) levando a uma maior absorção de luz no esmalte e conversão em calor. Quando a hidroxiapatita é aquecida a temperaturas maiores que 400°C, é possível obter uma diminuição ou completa eliminação do carbonato da superfície de esmalte, aumentando assim a resistência ácida (McCORMACK et al., 1995; ZUERLEIN; FRIED; FEATHERSTONE, 1999).

Os resultados do Experimento 1 mostraram que, por meio da metodologia empregada, não foi encontrada nenhuma interação significativa entre o desafio erosivo e a irradiação com laser de CO₂; em outras palavras, o tratamento com laser de CO₂ no comprimento de onda 10.6µm não foi capaz de controlar o desgaste do esmalte causado por ácido cítrico quando avaliado por perfilometria óptica 3D. Nas imagens de microscopia eletrônica de varredura, a superfície dos espécimes não irradiados após o desafio erosivo foi similar aos não irradiados e não erodidos com os prismas de esmalte levemente expostos. Os espécimes irradiados preservaram sua camada de esmalte mais superficial. Após a fase *in situ*, os espécimes que foram irradiados e erodidos apresentaram uma superfície mais homogênea quando comparada aos não irradiados e erodidos.

Buscando um aumento da resistência ácida do esmalte, estudos têm sugerido que, quando irradiado, a temperatura do esmalte deve variar entre 600 e 900 °C, levando assim a mudanças como aumento dos cristais de

hidroxiapatita (FERREIRA et al., 1989; McCORMACK et al., 1995), derretimento (FERREIRA et al., 1989; KURODA; FOWLER, 1984; McCORMACK et al., 1995; MEURMAN et al., 1992; NELSON et al., 1987; TSAI et al., 2002), fusão e recristalização (KANTOLA, 1972). No presente estudo, o emprego de duração de pulso mais baixas e densidades de energia mais baixas (0.04 J/cm^2), as quais causam menos mudanças morfológicas, podem não ter sido adequadas para produzir os efeitos esperados. Estes parâmetros foram empregados buscando promover menor propagação de calor para as camadas internas do dente, diminuindo o risco de dano pulpar (FRIED et al., 1996). ESTEVES-OLIVEIRA et al. (2011) e RAMALHO et al. (2013), empregando densidades de energia mais altas (0.3 J/cm^2), encontraram uma redução do desgaste do esmalte após erosão, e diminuição da perda mineral, além do reendurecimento do esmalte erodido, respectivamente.

No primeiro experimento, usando um perfil topográfico para avaliar a redução da progressão das lesões de erosão, foram avaliadas somente mudanças estruturais, e estas mudanças, tais como irregularidades, podem ter mascarado uma possível ação positiva da irradiação com laser de CO_2 relacionada a mudanças químicas, as quais poderiam aumentar a resistência do esmalte a desafios erosivos subsequentes.

Avaliando-se os resultados encontrados no segundo experimento, não foi encontrada interação significativa entre os desafios erosivo-abrasivo e a irradiação com laser de CO_2 , ou seja, o tratamento com laser de CO_2 no comprimento de onda $10.6 \mu\text{m}$ não foi capaz de controlar o desgaste abrasivo do esmalte erodido. Nas imagens de microscopia eletrônica de varredura, uma camada potencialmente protetora formada no esmalte dental foi removida após os desafios erosivos, expondo os prismas de esmalte. Os espécimes irradiados e erodidos que foram submetidos a desafios abrasivos apresentaram uma superfície de esmalte irregular, com grande exposição dos prismas de esmalte, enquanto os espécimes não irradiados e erodidos que foram abrasionados apresentaram um grande desgaste dos prismas, os quais estavam em formato côncavo. De forma geral, após os desafios abrasivos, os espécimes irradiados e erodidos preservaram mais dos seus prismas do que os não irradiados.

Estudos recentes têm se preocupado principalmente com a abrasão dos tecidos duros dentais erodidos causada pela escovação com diferentes escovas de dente e dentifrícios (WIEGAND et al., 2013; FERREIRA, 2013) e, até o presente momento, apenas ESTEVES-OLIVEIRA et al. (2011) empregou o laser de CO₂ para prevenir a abrasão pela escovação do esmalte amolecido por ácido.

A alta absorção pelo esmalte apresentada pelo comprimento de onda 10.6 µm do laser de CO₂ pode proporcionar uma efetiva interação laser-tecido (FRIED et al., 1996). Esta absorção também implica que a maior parte da luz laser é absorvida nos primeiros 10-12mm mais externos da superfície, diminuindo assim o risco de danos à dentinas ou à polpa. No Experimento 2, a escolha por uma baixa densidade de energia foi feita visando causar menos mudanças morfológicas, mas, por outro lado, causou, ao mesmo tempo, um aumento limitado na resistência ácida do esmalte (ZUERLEIN; FRIED; FEATHERSTONE, 1999; McCORMACK et al., 1995).

Os resultados promissores encontrados por ESTEVES-OLIVEIRA et al. (2011) quando irradiando o esmalte com laser de CO₂, com diminuição da abrasão pela escovação do esmalte amolecido, estão em desacordo com os resultados encontrados no Experimento 2. Por esta razão, nós devemos levar em consideração que os desafios erosivos e abrasivos realizados no presente estudo foram mais agressivos que aqueles realizados por ESTEVES-OLIVEIRA et al. (2011). Dessa forma, além do conjunto de parâmetros do laser de CO₂ empregados no presente estudo ter sido mais baixo, as condições que ele deveria controlar foram mais severas.

Enquanto a escovação dental é considerada um fator de menor importância para abrasão do esmalte e dentina sadios (ADDY; HUNTER, 2003), ela representa um fator de risco significante em lesões de erosão (BRANDINI et al., 2011; LUSSI; SCHAFFNER, 2000). Na erosão dental, a desmineralização inicial resulta em amolecimento do esmalte dental originalmente duro (FEATHERSTONE; LUSSI, 2006). Esta camada de esmalte amolecido é altamente susceptível a forças físicas e pode ser facilmente removida pela escovação dental (VORONETS; LUSSI, 2010; VORONETS et

al., 2008), além disso, o contato persistente com ácido induz mais desmineralização e contribui para a perda gradual do esmalte dental (GANSS; LUSSI, 2006). Assim, o esmalte irradiado com laser teria que apresentar maior resistência não somente aos ataques ácidos, mas também à situação clínica muito agressiva e comum, que é a força da escovação após a exposição ao ácido (YU et al., 2009).

Para ambos os experimentos, foi escolhido ácido cítrico devido ao seu uso muito difundido como um aditivo para alimentos ou bebidas, o que pode resultar em lesões erosivas moderadas *in vivo* se consumidos excessivamente ao longo de um grande número de vezes (ZERO, 1996), tendo seu uso já sido validado para estudos de erosão dental (WEST 1998). Algumas destas bebidas parecem ser mais erosivas do que as outras, com o mesmo pH. Conforme o ácido cítrico entra em contato com a superfície do dente, através de suas propriedades quelantes ele é capaz de aumentar o processo erosivo *in vivo* pela interação com a saliva, diminuindo o pH da cavidade oral (WEST; HUGHES; ADDY, 2001), aumentando o amolecimento e dissolvendo o conteúdo mineral do esmalte (MEURMAN; TEN CATE, 1996). Ao invés de um alimento ou bebida comercialmente disponível, a solução ácida foi a nossa opção visando minimizar os efeitos incontrolláveis de outros ingredientes.

Buscando simular o tratamento do esmalte previamente erodido, em ambos os experimentos foram realizados desafios erosivos *in vitro* (2 vezes ao dia, 2 dias), prévios à irradiação com laser de CO₂, diferentemente do que ocorre na maioria dos estudos de erosão dental (ESTEVES-OLIVEIRA et al., 2011; RAMALHO et al., 2013; STEINER-OLIVEIRA et al., 2010; WIEGAND et al., 2010), os quais buscam pela prevenção de uma lesão de erosão não existente ao invés de controlar uma lesão já estabelecida.

Modelos *in situ* representam um estágio intermediário entre os estudos *in vitro* e os ensaios clínicos (SONJU CLASEN; ØGAARD, 1999) e proporcionam condições para a determinação da resistência dental aos desafios ácidos e abrasivos na presença de saliva e película adquirida. A saliva oferece proteção contra a erosão do esmalte por meio de suas propriedades, tais como capacidade tampão, remoção dos agentes erosivos e formação da

película adquirida, a qual fornece proteção parcial contra desafios erosivos (HANNIG; BALZ, 1999). Entretanto, como os desafios erosivos foram realizados extraoralmente no presente estudo, pode-se assumir que os espécimes não foram beneficiados com todas estas propriedades. Ambos os experimentos simularam uma situação diária, na qual a ingestão de bebidas ácidas 3 vezes ao dia é considerada alta frequência de consumo e fator de risco para erosão dental (O'SULLIVAN; CURZON, 2000).

Visando padronizar o máximo possível o parâmetro abrasão, as escovas de dente foram fixadas em um dispositivo que fornece a mesma força (1.5N) para todas as escovas de dente. Sabe-se que a susceptibilidade à abrasão por escovação da camada subsuperficial dos espécimes de esmalte brevemente erodidos depende da força aplicada, sendo mais pronunciada quando aplicadas forças maiores que 3,5N (WIEGAND; KÖWING; ATTIN, 2007). Tem sido demonstrado que a resistência à abrasão do esmalte amolecido aumenta com períodos de remineralização (ATTIN et al., 2001) e que um tempo mínimo de 60 minutos entre o desafio erosivo e a escovação é necessário para aumentar a resistência à abrasão do esmalte amolecido pela erosão para o nível dos tecidos duros dentais hígidos (JAEGGI; LUSI, 1999; ATTIN et al., 2001). O tempo de escovação de 30 segundos para cada espécime parece adequado para indivíduos com alto nível de higiene oral.

Entre as análises disponíveis para quantificar a perda de tecido duro dental devido à erosão, atenção especial tem sido dada à perfilometria, uma vez que ela pode ser facilmente realizada, é capaz de avaliar mudanças iniciais na superfície e também a perda de tecido em estágios avançados. Esta análise é indicada para avaliar o esmalte enquanto as mudanças nos conteúdos minerais da subsuperfície são relativamente pequenas (GANSS et al., 2009), e o perfilômetro não contato minimiza possíveis erros nos resultados quando analisando superfícies amolecidas (BARBOUR; REES, 2004). O emprego da perfilometria foi validado para erosão (GANSS et al., 2005), sendo considerado “padrão ouro” (HALL et al., 1997). Nos dois experimentos que compõem esta tese, para preparar os espécimes para a quantificação do desgaste por meio do perfilômetro, a superfície de esmalte foi planificada e polida perpendicular

(90°) aos prismas de esmalte buscando obter superfícies uniformes, como recomendado por HJORSTJÖ (2010). No entanto, devido à curvatura dos dentes, isto pode não acontecer sempre, e os espécimes podem expor os prismas de esmalte de forma diferente, afetando assim sua susceptibilidade ao ácido (GANSS; KLIMEK; SCHWARZ, 2000; RIOS, 2006).

Os resultados da presente pesquisa abrem perspectivas para que estudos futuros sejam conduzidos com o objetivo de investigar o mecanismo de ação do laser de CO_2 no controle da progressão de lesões de erosão e erosão + abrasão nos tecidos dentais. Cumpre ressaltar que comparações mais apropriadas dos resultados dessa pesquisa com aqueles relatados na literatura foram escassas em virtude da pequena quantidade de trabalhos *in situ* utilizando o laser de CO_2 no controle da abrasão. Ademais, os achados da literatura são conflitantes sob muitos aspectos, especialmente no que se refere ao comprimento de onda dos equipamentos e parâmetros de irradiação do laser de CO_2 .

6. Conclusões

6. Conclusões

Em condições intraorais, a irradiação com laser de CO₂ não controlou a progressão de lesões de erosão e erosão + abrasão no esmalte causadas por ácido cítrico.

7. Referências Bibliográficas

7. Referências Bibliográficas

1. ADDY, M.; HUNTER, M.L. Can tooth brushing damage your health? Effects on oral and dental tissues. **International Dental Journal**, v.53, n.4, p.177–186, 2003.
2. AMAECHI, B.T.; HIGHAM, S.M.; EDGAR, W.M.; MILOSEVIC, A. Thickness of acquired salivary pellicle as a determinant of the sites of dental erosion. **Journal of Dental Research**, v.78, n.12, p.1821-1828, 1999.
3. AMAECHI, B.T.; HIGHAM, S.M. Dental erosion: possible approaches to prevention and control. **Journal of Dentistry**, v.33, n.3, p.243-252, 2005.
4. AMAECHI, B.T.; HIGHAM, S.M. Eroded enamel lesion demineralization by saliva as a possible factor in the site-specificity of human dental erosion. **Archives of Oral Biology**, v.46, n.8, p.697-703, 2001.
5. ATTIN, T.; BUCHALLA, W.; GOLLNER, M.; HELLWIG, E. Use of variable remineralization periods to improve the abrasion resistance of previously eroded enamel. **Caries Research**, v.34, n.1, p.48–52, 2000.
6. ATTIN, T.; KNÖFEL, S.; BUCHALLA, W.; TÜTÜNCÜ, R. In situ evaluation of different remineralization periods to decrease brushing abrasion of demineralized enamel. **Caries Research**, v.35, n.3, p.216-222, 2001.
7. BARBOUR, M.E.; REES, J.S. The laboratory assessment of enamel erosion: a review. **Journal of Dentistry**, v.32, n.8, p.591-602, 2004.
8. BARTLETT, D. Intrinsic causes of erosion. **Monographs in Oral Science**. Basel, Karger, 20: 119-139; 2006.
9. BARTLETT, D.W.; FARES, J.; SHIRODARIA, S.; CHIU, K.; AHMAD, N.; SHERRIFF, M. The association of tooth wear, diet and dietary habits in adults aged 18-30 years old. **Journal of Dentistry**, v.39, n.12, p.811-816, 2011.
10. BRANDINI, D.A.; DE SOUSA, A.L.B.; TREVISAN, C.L.; PINELLI, L.A.P.; SANTOS, S.C.D.; PEDRINI, D.; PANZARINI, S.R. Noncaries cervical lesions and their association with toothbrushing practices: in vivo evaluation. **Operative Dentistry**, v.36, n.6, p.581–589, 2011.

11. CHEAIB, Z.; LUSSI, A. Impact of acquired enamel pellicle modification on initial dental erosion. **Caries Research**, v.45, n.2, p.107-112, 2011.
12. COCHRANE, N.J.; YUAN, Y.; WLAKER, G.D.; SHEN, P.; CHANG, C.H.; REYNOLDS, C.; REYNOLDS, E.C. Erosive potential of sports beverages. **Australian Dental Journal**, v. 57, n.3, p.359-364, 2012.
13. COHEN, J.; FEATHERSTONE, J.D.B.; LE, C.Q.; STEINBERG, D.; FEUERSTEIN, O. Effects of CO₂ laser irradiation on tooth enamel coated with biofilm. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 46, n.3, p.216–223, 2014.
14. EHLEN, L.A.; MARSHALL, T.A.; QIAN, F.; WEFEL, J.S.; WARREN, J.J. Acidic beverages increase the risk of in vitro tooth erosion. **Nutrition Research**, v.28, n.5, p.299-303, 2008.
15. EISENBURGER, M.; SHELLIS, R.P.; ADDY, M. Comparative study of wear of enamel induced by alternating and simultaneous combinations of abrasion and erosion in vitro. **Caries Research**, v.37, n.6, p.450-455, 2003.
16. ESTEVES-OLIVEIRA, M.; PASAPORTI, C.; HEUSSEN, N.; EDUARDO, C.P.; LAMPERT, F.; APEL, C. Rehardening of acid-softened enamel and prevention of enamel softening through CO₂ laser irradiation. **Journal of Dentistry**, v.39, n.6, p.414-421, 2011.
17. ESTEVES-OLIVEIRA, M.; YU, H.; DE PAULA EDUARDO, C.; MEISTER, J.; LAMPERT, F.; ATTIN, T.; WIEGAND, A. Screening of CO₂ laser (10.6um) parameters for prevention of enamel erosion. **Photomedicine and Laser Surgery**, v.30, n.6, p.331-338, 2012.
18. ESTEVES-OLIVEIRA, M.; PASAPORTI, C.; HEUSSEN, N.; EDUARDO, C.P.; LAMPERT, F.; APEL, C. Prevention of toothbrushing abrasion of acid-softened enamel by CO₂ laser irradiation. **Journal of Dentistry**, v.39, n.9, p.604-611, 2011.
19. FEATHERSTONE, J.D.; BARRETT-VEPONE, N.A.; FRIED, D.; KANTOROWITZ, SEKA W. CO₂ laser inhibitor of artificial caries-like lesions progression in dental enamel. **Journal of Dental Research**, v.77, n.6, p.1397-1403, 1998.
20. FEATHERSTONE, J.D.; NELSON, D.G. Laser effects on dental hard tissues. **Advances in Dental Research**, v.1, n.1, p.21-26, 1987.

21. FEATHERSTONE, J.D.B. ; LUSSI, A. Understanding the chemistry of dental erosion. **Monographs in Oral Science**. Basel, Karger, 66-76; 2006.
22. FEATHERSTONE, J.D.B. Caries detection and prevention with laser energy. **Dental Clinics of North American**, v.44, n.4, p.955-969, 2000.
23. FERREIRA, J.M.; PALAMARA, J.; PHAKEY, P.P.; RACHINGER, W.A.; ORAMS, H.J. Effects of the continuous-wave CO₂ laser on the ultrastructure of human dental enamel. **Archives of Oral Biology**, v.34, n.7, p.551-561, 1989.
24. FERREIRA, M.C.; RAMOS-JORGE, M.L.; DELBEM, A.C.B; VIEIRA, R.S. Effect of Toothpastes with Different Abrasives on Eroded Human Enamel: An *in situ/ex vivo* Study. **The Open Dentistry Journal**, v.30, n.7, p.132-139, 2013.
25. FRIED, D.; SEKA, W.; GLENA, R.E.; FEATHERSTONE, J.D.B. Thermal response of hard dental tissue to 9-11µm CO₂ laser irradiation. **Optical Engineering**, v. 35, p.1976-1984, 1996.
26. 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. **Archives of Oral Biology**, v.45, n.10, p.897-902, 2000.
27. GANSS, C.; LUSSI, A.; SCHARMANN, I.; WEIGELT, T.; HARDT, M.; KLIMEK, J.; SCHLUETER, N. Comparison of calcium analysis, longitudinal microradiography and profilometry for quantitative assessment of erosion in dentine. **Caries Research**, v.43, n.6, p.422-429, 2009.
28. GANSS, C.; LUSSI, A. Diagnosis of erosive tooth wear. **Monographs in Oral Science**. Basel, Karger, 20: 32-43; 2006.
29. GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ, A.; LÓPEZ-GONZÁLEZ, J.D.; DEL CASTILHO, J.D.L.; VILLALBA-MORENO, J. Comparison of effects of diode laser and CO₂ laser on human teeth and their usefulness in topical fluoridation. **Lasers in Medical Science**, v.26, n., p.317–324, 2011.
30. HALL, A.F.; SADLER, J.P.; STRANG, R.; DE JOSSELIN, D.J.; FOYE, R.H.; CREANOR, S.L. Application of transverse microradiography for measurement of mineral loss by acid erosion. **Advances in Dental Research**, v.11, n.4, p.420-425, 1997.

31. HANNIG, M., BALZ, M. Influence of in vivo formed salivary pellicle on enamel erosion. **Caries Research**, v.33, n.5, p.372-379, 1999.
32. HARA, A.T.; ANDO, M.; GONZÁLEZ-CABEZAS, C.; CURY, J.A.; SERRA, M.C.; ZERO, D.T. Protective effect of the dental pellicle against erosive challenges in situ. **Journal of Dental Research**, v.85, n.7, p.612-616, 2006.
33. HJORTSJÖ, C.; JONSKI, G.; YOUNG, A.; SAXEGAARD, E. Effect of acidic fluoride treatments on early enamel erosion lesions - A comparison of calcium and profilometric analyses. **Archives of Oral Biology**, v.55, n.3, p.229-234, 2010.
34. HOOPER, S.M.; NEWCOMBE, R.G.; FALLER, R.; EVERSOLE, S.; ADDY, M.; WEST, N.X. The protective effects of toothpaste against erosion by orange juice: Studies in situ and in vitro. **Journal of Dentistry**, v.35, n.6, p.476-481, 2007.
35. HSU, C.Y.S.; JORDAN, T.H.; DEDERICH, D.N.; WEFEL, J.S. Effects of low-energy CO₂ laser irradiation and the organic matrix on inhibition of enamel demineralization. **Journal of Dental Research**, v.79, n.9, p.1725-1730, 2000.
36. HUYSMANS, M.C.; JAGER, D.H.; RUBEN, J.L.; UNK, D.E.; KLIJN, C.P.; VIEIRA, A.M. Reduction of erosive wear in situ by stannous fluoride-containing toothpaste. **Caries Research** v.45, n.6, p.518-523, 2011.
37. JAEGGI, T.; LUSSI, A. Prevalence, incidence and distribution of erosion. **Monographs in Oral Science**. Basel, Karger, 20:44-65; 2006.
38. JAEGGI, T.; LUSSI, A. toothbrush abrasion of erosively altered enamel after intraoral exposure to saliva: na in situ study. **Caries Research**, v.33, n.6, p.455-461, 1999.
39. JOHANSSON, A.K.; LINGSTROM, P.; BIRKHED, D. Comparison of factors potentially related to the occurrence of dental erosion in high- and low-erosion groups. **European Journal of Oral Sciences**, v.110, n.3, p.204-211, 2002.
40. KANTOLA, S. Laser induced effects on tooth structure. A study of changes in the calcium and phosphorus contents in dentine by electron probe microanalysis. **Acta Odontologica Scandinavica**, v.30, n.4, p.463-474, 1972.

41. KREULEN, C.M.; VAN'T SPIJKER, A.; RODRIGUEZ, J.M.; BRONKHORST, E.M.; CREUGERS, N.H.J.; BARTLETT, D.W. Systematic review of the prevalence of tooth wear in children and adolescents. **Caries Research**, v.44, n.2, p.151-159, 2010.
42. KURODA, S.; FOWLER, B.O. Compositional, structural and phase changes in vitro laser-irradiated human tooth enamel. **Calcified Tissue International**, v.36, n.4, p.361-369, 1984.
43. LEPRI, T.P.; COLUCCI, V.; TURSSI, C.P.; CORONA, S.A. Permeability of eroded enamel following application of different fluoride gels and CO₂ laser. **Lasers in Medical Science**, v.28, n.1, p.235-240, 2013.
44. LEVITCH, L.C.; BADER, J.D.; SHUGARS, D.A.; HEYMANN, H.O. Non-carious cervical lesions. **Journal of Dentistry**, v.22, n.4, p.195–207, 1994.
45. LUSSI, A.; JAEGGI, T.; JAEGGI-SCHÄRER, S. Prediction of the erosive potential of some beverages. **Caries Research**, v.29, n.5, p.349–354, 1995.
46. LUSSI, A.; JAEGGI, T.; ZERO, D. The role of diet in the aetiology of dental erosion. **Caries Research** v.38, n.1, p.34-44, 2004.
47. LUSSI, A.; JAEGGI, T. Erosion- diagnosis and risk factors. **Clinical Oral Investigations**, v.12, n.1, p.5-13, 2008.
48. LUSSI A, JAEGGI T. Extrinsic causes of erosion. **Monographs in Oral Science**, 20:77-87; 2006
49. LUSSI, A.; SCHAFFNER, M. Progression of and risk factors for dental erosion and wedge-shaped defects over a 6-year period. **Caries Research**, v.34, n.2, p.182–187, 2000.
50. MAGALHÃES, A.C.; RIOS, D.; DELBEM, A.C.B.; BUZALAF, M.A.R.; MACHADO, M.A.A.M. Influence of fluoride dentifrice on brushing abrasion of eroded human enamel: an in situ/ex vivo study. **Caries Research**, v.41, n.1, 77-79, 2007.
51. McCORMACK, S.M., FRIED, D.; FEATHERSTONE, J.D.B.; GLENA, R.E.; SEKA, W. Scanning electron microscope observations of CO₂ laser effects on dental enamel. **Journal of Dental Research**, v.74, n.10, p.1702-1708, 1995.

52. MCKNIGHT-HANES, C.; WHITFORD, G.M. Fluoride release from three glass ionomer materials and the effects of varnishing with or without finishing. **Caries Research**, v.26, n.5, p.345-350, 1992.

53. MEURMAN, J.H.; TEN CATE, J.M. Pathogenesis and modifying factors of dental erosion. **European Journal of Oral Sciences**, v.104, n.2, p.199–206, 1996.

54. MEURMAN, J.H.; VOEGEL, J.C.; RAUHAMAA-MÄKINEN, R.; GASSER, P.; THOMANN, J.M.; HEMMERLE, J.; LUOMANEN, M.; PAUNIO, I.; FRANK, R.M. Effects of carbon dioxide, Nd:YAG and carbon-dioxide-Nd:YAG combination lasers at high energy densities on synthetic hydroxyapatite. **Caries Research**, v.26, n.2, p.77-83, 1992.

55. NELSON, D.G.; WEFEL, J.S.; JONGEBLOED, W.L.; FEATHERSTONE, J.D. Morphology, histology and crystallography of human dental enamel treated with pulsed low-energy infrared laser radiation. **Caries Research**, v.21, n.5, p.411-426, 1987.

56. O’SULLIVAN, E.A.; CURZON, M.E.J. A comparison of acidic dietary factors in children with and without dental erosion. **Journal of Dentistry for Children**, v.67, n.3, p.186-192, 2000.

57. PIZZO, G.; LICATA, M.E.; PIZZO, I.; D’ANGELO, M. Plaque removal efficacy of power and manual toothbrushes: a comparative study. **Clinical Oral Investigations**, v.14, n.4, p.375-381, 2010.

58. RAMALHO, K.M.; DE PAULA EDUARDO, C.; HEUSSEN, N.; ROCHA, R.G.; LAMPERT, F.; APEL, C.; ESTEVES-OLIVEIRA, M. Protective effect of CO₂ laser (10.6 µm) and fluoride on enamel erosion in vitro. **Lasers in Medical Science**, v.28, n.1, p.71-78, 2013.

59. RIOS, D.; HONÓRIO, H.M.; MAGALHÃES, A.C.; MACHADO, M.A.A.M.; DELBEM, A.C.B.; SILVA, S.M.B. Effect of salivary stimulation on erosion subjected or not to abrasion in human and bovine enamel: an in situ/ex vivo study. **Caries Research**, v.40, n.3, p.218-223, 2006.

60. RODRIGUES, L.K.A.; SANTOS, M.N.; FEATHERSTONE, J.D. In situ mineral loss inhibition by CO₂ laser and fluoride. **Journal of Dental Research**, v.85, n.7, p.617-621, 2006.

61. SCATOLIN, R.S.; GALO, R.; CORONA, S.A. In situ effect of dentifrices associated to CO₂ laser in the permeability of eroded root dentin. **Photomedicine and Laser Surgery**, v.30, n.10, p.573-578. Epub 2012 Aug 13.
62. SHELLIS, R.P.; GANSS, C.; REN, Y.; ZERO, D.T.; LUSI, A. Methodology and models in erosion research: discussion and conclusions. **Caries Research**, v.45, n.1, p.69-77, 2011.
63. SONJU-CLASEN, A.B.; ØGAARD, B. Experimental intraoral caries models in fluoride research. **Acta Odontologica Scandinavica**, v.57, n.6, p.334–341, 1999.
64. SOUZA-GABRIEL, A.E.; COLUCCI, V.; TURSSI, C.P.; SERRA, M.C.; CORONA, S.A. Microhardness and SEM after CO₂ laser irradiation or fluoride treatment in human and bovine enamel. **Microscopy Research and Technique**, v.73, n.11, p.1030-1035, 2010.
65. STEINER-OLIVEIRA, C.; NOBRE-DOS-SANTOS, M.; ZERO, D.T.; ECKERT, G.; HARA, A.T. Effect of a pulsed CO₂ laser and fluoride on the prevention of enamel and dentine erosion. **Archives of Oral Biology**, v.55, n.2, p.127-133, 2010.
66. STEINER-OLIVEIRA, C.; RODRIGUES, L.K.; LIMA, E.B.; SANTOS, M.N. Effect of the CO₂ laser combined with fluoridated products on the inhibition of enamel demineralization. **Journal of Contemporary Dental Practice**, v.9, n.2, 113-121, 2008.
67. TANTBIROJN, D.; PINTADO, M.R.; VERSLUIS, A.; DUNN, C.; DELONG, R. Quantitative analysis of tooth surface loss associated with gastroesophageal reflux disease: a longitudinal clinical study. **Journal of the American Dental Association**; v.143, n.3, p.278-285, 2012.
68. TEPPER, S.A.; ZEHNDER, M.; PAJAROLA, G.F.; SCHMIDLIN, P.R. Increased fluoride uptake and acid resistance by CO₂ laser-irradiation through topically applied fluoride on human enamel in vitro. **Journal of Dentistry**, v.32, n.8, p.635–641, 2004.
69. TSAI, C.L.; LIN, Y.T.; HUANG, S.T.; CHANG, H.W. In vitro acid resistance of CO₂ and Nd:YAG laser treated human tooth enamel. **Caries Research**, v.36, n.6, p.423-429, 2002.

70. VIANA, P.S.; MACHADO, A.L.; GIAMPAOLO, E.T.; PAVARINA, A.C.; VERGANI, C.E. Disinfection of bovine enamel by microwave irradiation: effect on the surface microhardness and demineralization/remineralization processes. **Caries Research**, v.44, n.4, p.349-357, 2010.
71. VORONETS, J.; JAEGGI, T.; BUERGIN, W.; LUSI, A. Controlled toothbrush abrasion of softened human enamel. **Caries Research**, v.42, n.4, 286–290, 2008.
72. VORONETS, J.; LUSI, A. Thickness of softened human enamel removed by toothbrush abrasion: an in vitro study. **Clinical Oral Investigations**, v.14, n.3, p.251–256, 2010.
73. WEST, N.X.; HUGHES, J.A.; ADDY, M. The effect of pH on the erosion of dentine and enamel by dietary acids in vitro. **Journal of Oral Rehabilitation**, v. 28, n.9, p.860-864, 2001.
74. WEST, N.X.; MAXWELL, A.; HUGHES, J.A.; PARKER, D.M.; NEWCOMBE, R.G.; ADDY, M. A method to measure clinical erosion: the effect of orange juice consumption on erosion of enamel. **Journal of Dentistry**, v.26, n.4, p.329-335, 1998.
75. WIEGAND, A.; BURKHARD, J.P.M.; EGGMANN, F.; ATTIN, T. Brushing force of manual and sonic toothbrushes affects dental hard tissue abrasion. **Clinical Oral Investigations**, v.17, n.3, p.815–822, 2013.
76. WIEGAND, A.; HIESTAND, B.; SENER, B.; MAGALHÃES, A.C.; ROOS, M.; ATTIN, T. Effect of TiF_4 , ZrF_4 , Hf_4F and AmF on erosion and erosion/abrasion of enamel and dentin in situ. **Archives of Oral Biology**, v.55, n.3, p.223-228, 2010.
77. WIEGAND, A.; KÖWING, L.T.; ATTIN, T. Impact of brushing force on abrasion of acid-softened and sound enamel. **Archives of Oral Biology**, v.52, n.11, p.1043-1047, 2007.
78. WIEGAND, A.; MAGALHÃES, A.C.; NAVARRO, R.S.; SCHMIDLIN, P.R.; RIOS, D.; BUZALAF, M.A.; ATTIN, T. Effect of titanium tetrafluoride and amine fluoride treatment combined with carbon dioxide laser irradiation on enamel and dentin erosion. **Photomedicine and Laser Surgery**, v.28, n.2, p.219-226, 2010a.
79. WIEGAND, A.; ATTIN, T. Design of erosion/abrasion studies – insights and rational concepts. **Caries Research**, v.45, n.1, p.53-59, 2011.

80. YU, H.; WEGEHAUPT, F.J.; WIEGAND, A.; ROOS, M.; ATTIN, T.; BUCHALLA, W. Erosion and abrasion of tooth-colored restorative materials and human enamel. **Journal of Dentistry**, v.37, n.12, p.913–922, 2009.
81. ZERO DT, LUSI A. Behavioral factors. **Monographs in Oral Science**, 20:100-105; 2006.
82. ZERO, D.T.; LUSI, A. Erosion – chemical and biological factors of importance to the dental practitioner. **International Dental Journal**, v.55, n.4, p.285-290, 2005.
83. ZERO, D.T. Etiology of dental erosion: Extrinsic factors. **European Journal of Oral Sciences**, v.104, n.2, p.162–177, 1996.
84. ZERO, D.T. In situ caries models. **Advances in Dental Research**, v.9, n.3, p.214-230, 1995.
85. ZUERLEIN, M.J.; FRIED, D.; FEATHERSTONE, J.D.B. Modeling the modification depth of carbon dioxide laser-treated dental enamel. **Lasers in Surgery and Medicine**, v.25, n.4, p.335–347, 1999.

ANEXO A – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO
PRETO/ FORP/ USP

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Análise in situ do efeito do laser de CO₂ no controle da progressão de lesões de erosão e abrasão no esmalte dental

Pesquisador: Taísa Penazzo Lepri

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 02110512.2.0000.5419

Instituição Proponente: Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto/ FORP/ USP

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 169.825

Data da Relatoria: 11/12/2012

Apresentação do Projeto:

O presente estudo, composto por 2 experimentos in situ, tem por objetivo avaliar o efeito da irradiação com laser de CO₂ no controle da progressão de lesões de erosão e, posteriormente, analisar a influência da abrasão nestas superfícies irradiadas e submetidas ao desafio erosivo. Nos dois experimentos a seleção dos espécimes será feita através de leituras de microdureza (25g, 5s). No primeiro experimento, composto por duas fases, 14 voluntários utilizarão dispositivos intrabucais contendo fragmentos de esmalte com lesões de erosão e tratados ou não com o laser de CO₂. Para formação de lesão de erosão, os espécimes serão submetidos a desafios ácidos iniciais in vitro duas vezes ao dia, durante dois dias, através de um regime alternado de erosão e remineralização. Para isso, os espécimes serão imersos individualmente em 25 ml de suco de laranja (pH 3,75) por 5 min sob agitação, enxaguados com água deionizada e armazenados em saliva artificial por 4 h. Metade do total de espécimes com lesões de erosão pré-formadas serão irradiados com laser de CO₂ ($\lambda = 10,6 \mu\text{m}$; 1,0 W) no modo ultrapulso. Para a fase in situ do experimento 1, os fragmentos de esmalte serão montados em dispositivo intrabucal para serem instalados nos participantes para a realização dos desafios erosivos, através da imersão dos dispositivos em 250 mL de suco de laranja, (8:00, 12:00, 16:00 e 20:00h) ou água mineral, de maneira alternada e independente. Os espécimes serão avaliados quanto à perfilometria em 3 momentos: inicial (baseline), após tratamento superficial, e após parte experimental in situ.

Em cada momento da análise de perfilometria por desgaste foram realizadas 3 leituras ao longo da

Endereço: Avenida do Café s/n°

Bairro: Monte Alegre

CEP: 14.040-904

UF: SP

Município: RIBEIRÃO PRETO

Telefone: (16)3602-0251

Fax: (16)3602-4102

E-mail: cep@forp.usp.br

superfície do esmalte. No segundo experimento, o preparo e seleção dos espécimes de esmalte bovino, a indução das lesões de erosão iniciais e os tratamentos serão realizados como no primeiro experimento. Após a realização dos tratamentos, os espécimes serão montados em dispositivo palatino para serem instalados nos participantes para

a realização dos desafios erosivo e erosivo/abrasivo. Um dos lados do dispositivo palatino será submetido aos desafios erosivos, que serão realizados conforme descrito anteriormente para o experimento 1. O outro lado será submetido ao desgaste abrasivo através de escovação padronizada com auxílio de uma escova dental elétrica e slurry de dentífrico sem flúor (9h, 13h e 17h). Os espécimes serão avaliados quanto à perfilometria em 3 momentos: inicial (baseline), após tratamento superficial, e após parte experimental in situ. Em cada momento da análise de perfilometria por desgaste foram realizadas 3 leituras ao longo da superfície do esmalte. Os dados obtidos nos dois experimentos serão submetidos à análise estatística, de forma separada e independente.

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar o efeito do laser de CO₂ no controle da progressão de lesões de erosão no esmalte dental.

Avaliar a influência da abrasão nas superfícies erodidas, previamente irradiadas e submetidas ao desafio ácido.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Os voluntários poderão sentir um leve desconforto pelo uso do aparelho removível, que será minimizado com ajuste criterioso do dispositivo. Porém, este possível desconforto é totalmente suportável e não acarreta riscos à saúde geral ou bucal do voluntário.

Benefícios:

Os voluntários receberão benefícios indiretos, através de esclarecimento de certas questões relevantes para a Dentística, por meio da divulgação dos resultados no meio científico.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A introdução apresentada justifica a condução do projeto.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Não há.

Recomendações:

Sugiro a aprovação deste projeto pelo comite

Endereço: Avenida do Café s/n°			
Bairro: Monte Alegre	CEP: 14.040-904		
UF: SP	Município: RIBEIRAO PRETO		
Telefone: (16)3602-0251	Fax: (16)3602-4102	E-mail: cep@forp.usp.br	

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

As pendências encontradas foram devidamente corrigidas

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

RIBEIRAO PRETO, 12 de Dezembro de 2012

Assinador por:
Ana Maria Razaboni
(Coordenador)

Endereço: Avenida do Café s/nº

Bairro: Monte Alegre

CEP: 14.040-904

UF: SP

Município: RIBEIRAO PRETO

Telefone: (16)3602-0251

Fax: (16)3602-4102

E-mail: cep@forp.usp.br

ANEXO B – Comprovante do aceite do artigo “*In situ* analysis of CO₂ laser irradiation on controlling progression of erosive lesions on dental enamel” pela revista Microscopy Research and Technique.

- Microscopy Research and Technique - Decision . (5) ★

● **mrt.diaspro@iit.it**

11 de Abr ★

Para Eu, nelsoncorona@uol.com.br

11-Apr-2014

Dear Miss Lepri,

Manuscript ID MRT-14-077 entitled "In situ analysis of CO₂ laser irradiation on controlling progression of erosive lesions on dental enamel" which you submitted to Microscopy Research and Technique, has been reviewed. The comments of the referee(s) are included at the bottom of this letter.

The referee(s) have recommended publication, but also suggest some minor revisions to your manuscript. Therefore, I invite you to respond to the referee(s)' comments and revise your manuscript.

You can upload your revised manuscript and submit it through your Author Center. Log into <http://mc.manuscriptcentral.com/mrt> and enter your Author Center, where you will find your manuscript title listed under "Manuscripts with Decisions".

When submitting your revised manuscript, please include a point by point response to the reviewers which you must upload into the "response to decision letter" box. Please also highlight your manuscript with red text where you made changes.

IMPORTANT: We have your original files. When submitting (uploading) your revised manuscript, please delete the file(s) that you wish to replace and then upload the revised file(s).

Thank you for submitting your manuscript to Microscopy Research and Technique. I look forward to receiving your revision.

Sincerely,

Prof. Alberto Diaspro
Review Editor, Microscopy Research and Technique
mrt.diaspro@iit.it, alberto.diaspro@iit.it