*Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto*

JULIA BARONE DE ANDRADE

**Efeito do refluxo duodenogástrico no
esmalte dental**

Ribeirão Preto

2015

JULIA BARONE DE ANDRADE

Efeito do refluxo duodenogástrico no esmalte dental

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia
de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para
a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Programa: Odontologia Restauradora

Área de concentração: Odontologia Restauradora

Opção: Dentística

Orientadora: Profa. Dra. Regina Guenka Palma Dibb

Versão Corrigida

**Ribeirão Preto
2015**

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

Catálogo da Publicação

Preparada pela Biblioteca do Serviço de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

Andrade, Julia Barone

Efeito do refluxo duodenogástrico no esmalte dental, Ribeirão Preto, 2015

86p. : il. ; 30cm

Dissertação de Mestrado (versão corrigida da Dissertação. A versão original se encontra disponível na Unidade que aloja o Programa), apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Odontologia Restauradora – Opção: Dentística.

Orientadora: Palma-Dibb, Regina Guenka

1. Erosão dental; 2.Refluxo; 3. Refluxo duodenogástrico; 4. Esmalte Dental

Andrade, Julia Barone. **Efeito do refluxo duodenogástrico no esmalte dental.**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Odontologia Restauradora

Aprovado em: 01/04/2015

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à:

Aos meus **pais**, *Antônio Valmir e Dulce*, que sempre acreditaram e investiram no poder da educação e em minha capacidade.

Aos meus **irmãos**, *Henrique e Alice*, que são exemplos de caráter e perseverança sem nunca perder a essência e doçura.

Ao *Lucas*, meu **noivo**, que trouxe a minha vida a serenidade e amor que faltavam, me apoiando e me completando mais a cada dia.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À professora e orientadora *Regina Guenka Palma Dibb*, que sempre esteve presente e disponível para ensinar e orientar. Exemplo de profissional e pessoa que levarei sempre comigo.

À pesquisadora *Juliana Jediroba Faraoni Romano*, que desde o primeiro dia me recebeu com um sorriso no rosto e muita vontade de ajudar. Muito obrigada!

AGRADECIMENTOS

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, representada pelo Digníssimo Diretor **Prof. Dr. Valdemar Mallet de 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 Curso de Pós-Graduação em Odontologia Restauradora da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto na pessoa do **Prof. Dr. Manoel Damião de Souza Neto**. Agradeço pela compreensão e orientação nos momentos necessários.

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

À Comissão de Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, na pessoa da **Profa. Dra. Maria Cristina Borsatto**.

A **FAPESP** (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), pelo apoio e financiamento que possibilitaram a realização deste trabalho.

Aos professores membros da banca, agradeço a disponibilidade e dedicação do tempo a este trabalho.

Aos professores do Departamento de Odontologia Restauradora da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

Aos alunos da pós-graduação da FORP-USP, com as quais dividimos divertidos e agradáveis momentos.

Ao Carlos Feitosa dos Santos, secretário do Curso de Pós-graduação em Odontologia Restauradora da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto

da Universidade de São Paulo, pela dedicação e amor que dedica a todos os alunos de pós-graduação.

A Isabel Sola e Regiane Sacilotto, secretárias da Seção de Pós-graduação da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

Aos professores e funcionários da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

EPÍGRAFE

*“A mente que se abre a uma nova ideia
jamais voltará ao seu tamanho original”*

Albert Einstein

RESUMO

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos do líquido de origem estomacal e duodenal na superfície do esmalte dental, simulando a ação do líquido refluído em pacientes com refluxo duodenogástrico. A partir de incisivos bovinos obteve-se fragmentos de esmalte medindo 4x4x2mm, e após o polimento, foram selecionados 40 espécimes através do teste de microdureza. Os espécimes foram isolados com resina composta deixando apenas metade da superfície do esmalte exposta aos desafios erosivos, foram então divididos aleatoriamente em quatro grupos (n=10), G1: HCl (pH 2,0), G2: HCl + Pepsina (pH = 2,1), G3: HCl + Bile de boi + NaHCO₃ (pH 3,0), G4: HCl + Pancreatina + NaHCO₃ (pH 3,0). Os fragmentos foram expostos em soluções a 37°C, 6x/dia, durante 20s sob agitação por cinco dias, posteriormente foram analisados por meio da avaliação morfológica, da rugosidade superficial e do desgaste (degrau) do esmalte dental com microscopia confocal a laser, em seguida os espécimes foram seccionados longitudinalmente, planificados e polidos para a realização da microdureza longitudinal, onde foram realizadas 15 medidas em cada área (controle/protegida e exposta). Os dados foram analisados pelo teste Kruskal-Wallis e de Dunn's ($p < 0.05$) para diferenciação das médias. Na análise dos dados observou maior degrau e rugosidade da superfície para o G3 ($5,59 \pm 1,69$; $2,20 \pm 1,61$) e foi diferente estatisticamente significativa com os grupos 1 e 2 nas duas análises ($3,90 \pm 1,55$; $1,02 \pm 0,18$; $3,67 \pm 1,45$; $0,89 \pm 0,12$) ($p < 0,05$), apenas o degrau do G4 ($4,90 \pm 1,80$) foi semelhante ao G3 ($p > 0,05$). Na análise da microdureza não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Na análise morfológica observou-se maior perda estrutural nos grupos 3 e 4 com erosão intensa da região interprismática com áreas amorfas. Pode-se concluir que a bile e a pancreatina, de origem duodenal, em associação com o ácido clorídrico, podem promover uma erosão dentária mais intensa, com maior perda estrutural, aumento da rugosidade da superficial e perda da anatomia prismática do esmalte.

FAPESP (# 2013/01413-7).

Palavras-chave: Erosão Dental, Refluxo duodenogástrico, esmalte dental

ABSTRACT

ABSTRACT

The goal of this study was to evaluate the effects of stomach and duodenal fluid on the enamel surface, simulating the action of refluxed liquid in patients with duodenogastric reflux. Bovine incisors were selected in order to obtain enamel fragments measuring 4x4x2mm each, which were then polished and brought to a microhardness test, 40 final specimens were selected. The specimens were isolated with composite exposing only half of the enamel surface to erosive challenges and then randomly divided into 4 groups (n = 10), G1: HCl (pH 2.0); G2: HCl + pepsin (pH 2.1); G3: HCl + Ox Bile + NaHCO₃ (pH 3.0); G4: HCl + Pancreatin + NaHCO₃ (pH 3.0). The samples were exposed in 37°C solutions, 6x/day, for 20s, under stirring for 5 days. Subsequently, they were analyzed for morphologic evaluation, surface roughness and the step formed on the dental enamel, with confocal laser microscopy. The specimens were then cut longitudinally, their surfaces flattened and polished for holding the longitudinal microhardness, where 15 measurements were performed in each of the areas (control/protected and exposed). The data were analyzed using the Kruskal-Wallis test and Dunn's (p<0.05) means for differentiating. Both analysis showed a higher step and surface roughness for the G3 (5.59±1.69, 2.20 ± 1.61), a difference that was statistically significant within groups 1 and 2 (3.90 ± 1, 55, 1.02 ± 0.18, 3.67 ± 1.45, 0.89 ± 0.12) (p <0.05) and only the step in G4 (4.90, ± 1.80) was similar to G3 (P> 0.05). The analysis of microhardness showed no statistically significant difference between groups. Morphological analysis showed greater structural loss in groups 3 and 4 with intense erosion of interprismatic region with amorphous areas. Therefore, it can be concluded that bile and pancreatin, from duodeno, in combination with hydrochloric acid, may promote greater dental erosion, with greater loss of structure, increased surface roughness and loss of enamel prismatic anatomy.

FAPESP (# 2013/01413-7).

Keywords: Dental erosion, Duodenogastric reflux, Dental enamel

SUMÁRIO

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	37
2. PROPOSIÇÃO	43
3. MATERIAL E MÉTODO	47
4. RESULTADOS	59
5. DISCUSSÃO	67
6. CONCLUSÕES	75
7. REFERÊNCIAS	79

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A Doença do Refluxo Gastroesofágico (DRGE) vem afetando grande parte da população, especialmente nos países ocidentais (Spechler et al 1992; Dent et al 2005; Sifrim; Zerbib, 2012). No Brasil o índice de acometidos por esta doença crônica alcança os 11% (Chinzon, 2004), porém chega a afetar 1/3 da população de países industrializados (Meurman et al, 1994), um dos primeiros sinais bucais que ocorre é erosão de esmalte (Benages et al., 2006).

A erosão pode ocorrer por fatores extrínsecos e intrínsecos. Dentre os fatores extrínsecos estão a dieta ácida como refrigerantes e frutas cítricas e o uso de medicamentos, em que o consumo constante pode proporcionar perda de estrutura dentária. Os fatores intrínsecos são a xerostomia, a anorexia nervosa, a bulimia e a DRGE, sendo a erosão dental o sintoma extra-esofágico de maior prevalência na cavidade oral (Rapôso et al., 2010), tendo como agravante a regurgitação de suco gástrico (Benages et al., 2006), composto principalmente por HCl e pepsina (Vaezi et al., 1995).

A DRGE é caracterizada pelo fluxo retrógrado do conteúdo estomacal para o esôfago, esta doença pode levar a uma variedade de sinais e sintomas esofágicos ou extra-esofágicos podendo estar associada a lesões teciduais (Ranjitkar et al, 2012; Marsicano et al, 2013). A regurgitação e a pirose são consideradas os sintomas típicos (esofágicos), existem, porém, muitos outros sintomas atípicos (ou extra-esofágicos) como é o caso da asma, bronquite, pneumonia, rouquidão, pigarro, sinusite crônica, otalgia, xerostomia, aftas, halitose e a erosão dental (Gaynor, 2000). Porém, em alguns casos pode ocorrer uma alta frequência e quantidade de suco gástrico regurgitado, agravando a doença (Masclee et al., 1990; Benages et al., 2006).

Por sua vez, o refluxo duodenogástrico (RDG) é descrito como o fluxo contrário de secreções de origem duodenal para o estômago, trata-se de um evento fisiológico normal em períodos de jejum prolongado. Contudo, sua patogenicidade depende da frequência, quantidade e duração da exposição gástrica ao seu conteúdo, sendo denominado refluxo duodenogástrico primário quando ocorre em indivíduos não submetidos a cirurgias gástricas e que,

provavelmente, apresentam alguma disfunção do esfíncter pilórico (Kaminski; Kruel, 2011).

Quando o conteúdo do duodeno reflui para o estômago e posteriormente para o esôfago denomina-se refluxo duodeno-gastroesofágico, sendo alta sua prevalência em pacientes portadores da doença do refluxo gastroesofágico (Fein 2006). Bile e suco pancreático podem ser encontrados juntos ou separados em episódios de RDG sendo o aumento do pH mais frequentemente associado às enzimas do pâncreas do que com a bile (Fuchs et al, 1999). Em um estudo *in vivo* 86% dos pacientes portadores da doença do refluxo gastroesofágico e 58% dos pacientes saudáveis apresentaram pelo menos vestígios de bile no esôfago (Kauer et al., 1997). A partir do esôfago essas enzimas podem chegar à cavidade bucal. De Corso et al (2007), identificaram ácidos biliares na saliva de 32,6% dos pacientes em concentrações que variaram de 0,5 a 5,0mmol/L.

No estômago o excesso de refluxo de bile, suco pancreático e secreções intestinais pode causar gastrite de refluxo biliar (Mason; De Meester, 1999). Já no esôfago pode gerar esofagite grave (Fujikawa et al, 1994; Orel; Vidmar, 2007). Assim sendo, tanto os ácidos biliares quanto as enzimas de origem pancreática ou intestinal podem causar injúrias à mucosa gastrointestinal (Stein et al, 1999; Tibbling et al, 2002; Jolly et al. 2004).

O refluxo também pode ser classificado pelo valor do pH como ácido e não ácido, entre 4,0 e 7,0 é classificado como refluxo "fracamente ácido" e acima de 7,0 é classificado como "levemente alcalino". A mistura ácido-bile, após refluxo duodenogástrico apresenta pH final entre 4,0 e 7,0. O refluxo não ácido explica uma parcela significativa dos casos que continuam apresentando sintomas após o tratamento convencional (Carvalhoes, et al., 2009; Velanovich, 2009; Gawron; Hirano, 2010; Herbelli; Patti, 2010).

O suco gástrico, que possui pH em torno de 2.3 (Valena; Young, 2002), é composto principalmente por HCl e pepsina (Vaezi et al., 1995). A pepsina é uma enzima apenas produzida no estômago e que quando encontrada na saliva pode ser um método de diagnóstico do refluxo (Kim et al, 2008; Bardhan et al, 2012), seu pH mais ativo varia de 2,0 a 3,0 e sua atividade diminui com a

redução da acidez (Piper; Fenton, 1965). Em $\text{pH} < 2,0$ o dano tecidual é proporcional à quantidade de pepsina (Goldberg et al, 1969). O mesmo acontece com enzimas de origem duodenal, como a bile e a pancreatina, que podem ser encontradas na saliva de pacientes portadores da doença do refluxo duodenogástrico (Sereg-Bahar et al, 2014). Podendo atingir e prejudicar os tecidos dentais, ocasionando principalmente erosão.

Dentre o conteúdo do refluxo tem-se o suco pancreático, produzido pelo pâncreas é alcalino, com pH de 8,0 a 8,3, contem água, enzimas e grandes quantidades de bicarbonato de sódio. Outra secreção é a bile, produzida no fígado e armazenada na vesícula biliar. A bile vesicular tem pH que varia entre 5,0 e 6,0 devido a reabsorção de água, cloreto de sódio e bicarbonato da vesícula pela corrente sanguínea (Sanioto; Mello-Aires, 1999).

Hoje já se sabe que o material refluído pode ser composto tanto por líquido, gás ou a mistura dos dois (Sifrim; Blondeau, 2006). Recentemente demonstrou-se que este ácido clorídrico gasoso também pode levar a erosão dental. (Derceli, 2014). Porém pouco se sabe sobre a influência das enzimas de origem duodenal sobre esmalte dental.

A lesão bucal mais prevalente nestes tipos de pacientes é a erosão dental, que é definida como a perda localizada, crônica e/ou patológica de tecido mineral que é removido quimicamente da superfície do dente por meio de substâncias ácidas e alcalinas, é um fenômeno irreversível e que não envolve a ação bacteriana (Benages et al., 2006). Clinicamente apresenta-se com perda de brilho em algumas áreas do esmalte, de aspecto liso, sendo lesões largas e rasas sem ângulo nítido, superfície oclusal em forma de taça, dentina incisal exposta, aumento da translucidez. As restaurações tornam-se proeminentes devido a perda da superfície de esmalte em face palatina de dentes incisivos e/ou caninos. O diagnóstico precoce é difícil (Lussi, Ganss, 2011), com o avanço dos desgastes as lesões tornam-se visíveis podendo atingir a dentina provocando sensibilidade ao frio, ao calor e à pressão (Gandara; Truelove, 1999; Levitch et al, 1994; Young, 2001), neste estágio pode ser necessário o procedimento restaurador.

É possível diferenciar visivelmente as lesões erosivas de acordo com sua origem. Lesões com de causa extrínseca estão localizadas na vestibular dos dentes anteriores (Coleman, 1996), já as de origem intrínseca estão localizadas na palatina dos dentes anteriores e oclusal dos dentes superiores e inferiores (Gandara. Truelove, 1999), sendo uma lesão comum e que aumenta com a idade atingindo tanto a dentição decídua como na permanente (Kreulen et al, 2010). Outro fator relevante esta no fato de que a erosão dental atinge, se não todos, a maioria dos dentes da cavidade bucal (Barlett, 2007).

O pH do suco gástrico varia de 1 a 1,5 estando muito abaixo de 5,5, pH de dissolução da hidroxiapatita (Scheutzel, 1996). Em contrapartida, a atividade de descalcificação pode ser bastante intensa em ambientes que variam entre neutro e levemente ácido ($\text{pH} > 4$ e < 7), que são encontrados em casos de refluxos com conteúdos ácidos e duodenais (Higo et al, 2009).

Aparentemente o primeiro estágio da erosão causada pela DRGE é a perda de esmalte superficial pela regurgitação de ácido clorídrico líquido ou gasoso, posteriormente a destruição do elemento dental é acelerada pela mistura dos conteúdos gástrico e duodenal (Higo et al, 2009).

De acordo com a literatura, tanto as substâncias de origem gástrica (HCl e pepsina) como as de origem duodenal (bile e suco pancreático) são capazes de remover mineral da superfície dental e causar lesões de erosão, porém pouco se sabe a influência dessas substâncias sobre o esmalte dental. Desta forma, diante do grande índice de indivíduos portadores de refluxo duodenogástrico, no qual o líquido refluído é composto tanto por substâncias ácidas como alcalinas, torna-se relevante a avaliação da ação deste líquido na superfície do esmalte dental.

PROPOSIÇÃO

2. PROPOSIÇÃO

O objetivo do presente trabalho foi avaliar os efeitos de soluções que mimetizem a composição do líquido de origem estomacal e duodenal na superfície do esmalte dental, simulando a ação do líquido refluído sobre os dentes de pacientes com refluxo duodenogástrico, por meio da avaliação morfológica, da rugosidade superficial e do degrau formado no esmalte dental após os desafios erosivos, com microscopia confocal a laser e avaliação da microdureza longitudinal.

MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Delineamento Experimental

Este estudo *in vitro* teve como objetivo avaliar o efeito de soluções simulando o conteúdo de origem estomacal e duodenal no esmalte dental, simulando o que ocorre na cavidade bucal de indivíduos portadores da doença do refluxo duodenogástrico. O estudo avaliou a erosão dental em quatro níveis: 1- HCl (pH 2.0); 2- HCl + Pepsina (pH 2.1); 3- Bile de boi + HCl + NaHCO₃ (pH 3,0); 4- Pancreatina + NaHCO₃ + HCl (pH 3.0).

O estudo foi realizado de acordo com um delineamento em blocos completos casualizados. Os espécimes foram avaliados qualitativamente e quantitativamente. As variáveis de resposta quantitativa para o estudo *in vitro* foram a porcentagem de perda de dureza superficial e o degrau formado (em μm) e a rugosidade superficial (Ra em μm) e variável qualitativa foi a análise morfológica.

Secção dos dentes

Foram empregados incisivos bovinos limpos e armazenados em solução de formol a 2% com pH 7,0, extraídos a menos de três meses. Os dentes com presença de trincas profundas, rachaduras, manchas hipoplásicas ou acentuado desgaste foram descartados. As raízes foram removidas com disco diamantado (#7015, KG Sorensen, Barueri, 06454-920, Brazil) em máquina de corte (Minitom, Struers A/S, Copenhagen, DK-2610, Denmark) e em seguida as coroas foram fixadas em placa de acrílico para serem cortadas e assim foram obtidos fragmentos de esmalte nas dimensões de 4 x 4 x 2mm.

Em seguida, os fragmentos foram fixados em cilindros de resina acrílica para planificação e polimento em politriz Arotec APL-4 (Arotec S/A Ind. e Comércio, São Paulo/SP, Brasil) com lixa de óxido de alumínio de granulação #600 e #1200 e disco de feltro e suspensão de alumina 0,3 e 0,05 μm (Arotec Sij685 /A Ind. e Comércio, São Paulo/SP, Brasil). Ao final do polimento os espécimes ficaram imersos sob ação do ultrassom (Ultrasonic Cleaner T –

1449 – D, Odontobrás Indústria e Comércio, Ribeirão Preto – SP, Brasil) por 10 minutos, em água deionizada para lavagem e remoção de resíduos.

Derceli et al, 2014.

Figura 1: Preparo dos fragmentos dentais: A) Incisivo bovino; B) Coroa com local da obtenção do fragmento; C) Lixa d'água #600 e #1200 e alumina 0,3 e 0,05 µm; D) Fragmento 4x4x2mm planificado e polido.

Microdureza inicial

A fim de selecionar os quarenta espécimes que compuseram os grupos estudados, foi realizada a análise da microdureza inicial dos mesmos por meio de um microdurômetro Shimadzu Micro Hardness Tester HMV-2.000 (Shimadzu Corporation – Kyoto-Japan) com penetrador diamantado piramidal tipo Knoop, com carga estática de 25 gramas força, aplicada por 10 segundos. Foi realizada em cada amostra cinco indentações, sendo a primeira a 1mm de distância de uma das bordas do fragmento e entre cada indentação foi deixado 500 µm, em seguida foi calculada a média para cada dente, sendo desprezados aqueles que apresentaram valor 20% acima ou abaixo da média de todos os espécimes, e também aqueles com desvio-padrão interno (entre as marcações) acima de 20% do valor de sua própria média. Para tanto, os

mesmos foram fixados com cera pegajosa (Cera para escultura, Polidental Indústria e Comércio Ltda., São Paulo – SP, Brasil) a uma base de acrílico com o auxílio de um paralelômetro (EIQuip, São Carlos-SP, Brasil), de forma a deixar a superfície a ser analisada paralela à placa.

Preparo dos espécimes

Na sequência, o espécime foi todo isolado com resina composta (Filtek™ Z350XT, 3M ESPE, EUA), sem a utilização de ácido fosfórico e adesivo, isolando assim inclusive metade da área de esmalte, sendo esta a área controle, a outra metade que ficou exposta foi submetida aos desafios erosivos ($\approx 8\text{mm}^2$). Finalizado o preparo dos espécimes dentais, estes foram divididos aleatoriamente nos grupos experimentais de acordo com as substâncias que a que foram expostos.

Figura 2: Espécime isolado com resina composta (cortesia: Carmen V. T. Toro, 2014).

Grupos Experimentais

Por meio de estudos preliminares foi determinada as concentrações a serem empregadas neste estudo que foram divididas em 4 grupos.

Grupo 1 – Controle - Exposição dos fragmentos em HCl a 37 ° C - pH 2,0. – Simulação do suco gástrico sem enzima.

Preparação - 0.82 ml de HCl a 37% foi diluído em 1L de água deionizada a fim de obter uma solução de concentração 0,01M HCl com pH 2.0 a 37°C.

Grupo 2 - Exposição dos fragmentos em HCl + Pepsina (Pepsin - Fluka Chemical Corp, EUA) a 37 ° C - pH 2,1. - Simulação do suco gástrico com enzima.

Preparação - Em 1L de HCl pH 2,0 (obtida da mesma maneira que a solução anterior) foi diluída 1g de pepsina obtendo-se uma solução com pH 2,1 a 37°C.

Grupo 3 - Exposição dos fragmentos em HCl + Bile (Ox-bile, dehydrated, purified – Fluka Chemical Corp, EUA) a 37 ° C - pH 3,0. Simulação do suco biliar.

Preparação - Em 1L de HCl pH 2.0 (obtida da mesma maneira que a solução grupo 1) foi diluída 4g de bile de boi + 0,5g de NaHCO_3 a fim de se obter uma solução pH 3.0 a 37°C.

Grupo 4 - Exposição dos fragmentos em HCl + Pancreatina (Pancreatin from porcine pancreas – Sigma Chemical Co., EUA) 37 ° C - pH 3.0. - Simulação do suco pancreático

Preparação - Em 1L de HCl pH 2.0 (obtida da mesma maneira que a solução grupo 1) foi diluída 1g de pancreatina + 0,2g de NaHCO_3 para se obter uma solução de pH 3,0 a 37 ° C.

Desafios Erosivos

Cada espécime ficou imerso sob agitação em 5ml de solução por 20 segundos. Foram realizados 06 desafios por dia durante cinco dias consecutivos com intervalo de 1 hora entre os desafios. No intervalo dos desafios os corpos-de-prova foram mantidos imersos em 10ml de saliva artificial (trocada diariamente). As soluções foram trocadas e preparadas diariamente e mantidas a 37°C no pH constante com o objetivo de manter a ação das enzimas presentes.

Derceli, 2014

Figura 3: Desafios erosivos realizados a 37°C.

Finalizados os desafios erosivos, a resina composta foi removida delicadamente com auxílio de uma lâmina de bisturi expondo a área controle. Posteriormente os espécimes foram limpos, secos e armazenados em água destilada para a realização das análises.

Degrau e rugosidade superficial

O degraú e a rugosidade dos fragmentos de esmalte foram avaliados por meio do microscópio confocal a laser (Olympus LEXT, Japão), conectado a um computador com software específico (Olympus OLS4000®, Japão). Os espécimes foram posicionados paralelamente a mesa do microscópio com o auxílio de uma paralelômetro e foram realizadas as fotos em 3D com objetiva de 5x e aumento de 107x.

Após a obtenção da imagem em 3D gerada pelo microscópio confocal com aumento de 417x, foi analisado o degraú tendo como base a área hígida (protegida) até o ponto mais baixo da área erodida. Para cada espécime foram

realizadas 10 medidas englobando a área hígida e a área controle que permitiram a obtenção do degrau com o software específico.

Figura 4: Imagem do microscópio confocal a laser com as 10 medidas do degrau.

Figura 5: Gráfico do degrau formado entre a área hígida e erodida.

Após a obtenção da imagem em 3D gerada pelo microscópio confocal com aumento de 107x, foi analisado a rugosidade superficial tendo como base a área hígida (protegida). Tanto no lado controle como no lado submetido ao desafio erosivo foram realizadas 10 leituras da superfície, totalizando 20 leituras por espécime, que permitiram a obtenção da rugosidade, em μm , com

o software específico. Para análise da rugosidade foi realizada a média da área protegida (AP) e da área experimental (AE), e então a rugosidade foi obtida pela diferença da AE-AP.

Figura 6: Imagem do microscópio confocal a laser com as 20 medidas da rugosidade superficial.

Figura 7: Imagem ilustrativa onde é possível observar o degrau e a rugosidade de um espécime submetido aos desafios erosivos.

Microdureza longitudinal

Após a realização das análises no microscópio confocal a laser (Olympus LEXT OLS4000®, Japão), os espécimes foram seccionados ao meio com disco diamantado (#7015, KG Sorensen, Barueri, 06454-920, Brazil) em máquina de corte (Minitom, Struers A/S, Copenhagen, DK-2610, Denmark) obtendo-se um fragmento 4x2mm contendo área controle e área erodida. A face lateral do fragmento foi então planificada e polida em politriz Arotec APL-4 (Arotec S/A Ind. e Comércio, São Paulo/SP, Brasil) com lixa de óxido de alumínio de granulação #600 e #1200 e disco de feltro e suspensão de alumina 0,3 e 0,05 μm (Arotec Sj685 /A Ind. e Comércio, São Paulo/SP, Brasil). Ao final do polimento os espécimes ficaram imersos sob ação do ultrassom (Ultrasonic

Cleaner T – 1449 – D, Odontobrás Indústria e Comércio, Ribeirão Preto – SP, Brasil) por 10 minutos, em água deionizada para lavagem e remoção de resíduos.

O teste de microdureza Knopp final foi realizado em profundidade utilizando carga de 25gf por 10 segundos. As penetrações foram realizadas na região de subsuperfície na área erodida e na área controle. A primeira marcação foi em 30µm abaixo da borda de esmalte e as marcações seguintes em 40 e 50µm da borda e na mesma direção, em cada região foram feitas cinco colunas de endentações totalizando 15 endentações em cada área. Como controle em área hígida, foram realizadas, nas mesmas amostras, medidas nas mesmas profundidades citadas anteriormente, porém distantes 1000 µm da interface (área controle/experimental). Foi feita uma media de cada área (protegida e experimental) e então se calculou o percentual de variação da dureza da área exposta (AE) em relação à área controle (AC) pela formula: $\%VM = (AC-AE)*100/AC$.

Figura 8: Esquema da microdureza longitudinal com 15 endentações em cada área.

Análise morfológica

A avaliação morfológica dos fragmentos de esmalte após os desafios erosivos foi realizada por meio de um microscópio confocal a laser (Olympus LEXT, Japão), onde os espécimes foram posicionados paralelamente a mesa do microscópio com o auxílio de uma paralelômetro e conectado a um computador com um software específico (Olympus OLS4000®, Japão) por meio de uma objetiva de 100x, foram realizadas fotos em 3D com aumento de 2131x (130x129um) e foi realizada a análise morfológica de todos os espécimes.

Análise de Dados

Os dados do degrau e da rugosidade superficial foram analisados quanto a sua normalidade, como não foram normais optou-se pelo método não paramétrico de Kruskal-Wallis e teste de Dunn's para diferenciação das medias com $\alpha=5\%$. Os dados da microdureza longitudinal apresentaram-se normal e homogêneo, desta forma realizou-se o teste de análise de variância a 1 critério.

Para a variável de resposta qualitativa (análise morfológica em microscópio confocal a laser) foi realizada uma análise descritiva dos achados.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

Degrau

Na análise dos dados pode-se observar diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p < 0,05$), tendo o grupo 3 apresentado a maior média estatisticamente diferente do grupo 1 e 2 ($p < 0,05$), o grupo 4 foi semelhante a todos os grupos ($p > 0,05$). (Tabela e figura).

Tabela 1: Média (em μm) e desvio padrão do degraú para os diferentes grupos experimentais.

Grupos	Média/DP
G1 - HCl	3,90 $\pm$ 1,56 a
G2 - HCl + Pepsina	3,67 $\pm$ 1,45 a
G3 - HCl + Bile	5,58 $\pm$ 1,70 b
G4 - HCl + Pancreatina	4,90 $\pm$ 1,80 ab

*mesma letra similaridade estatística

Figura 9: Mediana do degraú dos diferentes grupos estudados.

Rugosidade Superficial

Analisando os dados da rugosidade observa-se diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p < 0,05$) tendo o grupo 3 apresentado maior valor e estaticamente superiores aos demais grupos ($p < 0,05$). Os grupos 1,2 e 4 apresentaram valores semelhantes entre si ($p > 0,05$). (Tabela e Figura)

Tabela 2: Média [em Ra (μm)] e desvio padrão da rugosidade superficial para os diferentes grupos experimentais.

Grupos	Valores de Rugosidade
G1 - HCl	1,03 $\pm$ 0,18 a
G2 - HCl + Pepsina	0,88 $\pm$ 0,23 a
G3 - HCl + Bile	2,20 $\pm$ 1,61 b
G4 - HCl + Pancreatina	0,93 $\pm$ 0,12 a

*mesma letra similaridade estatística

Figura 10: Mediana da rugosidade dos diferentes grupos estudados.

Microdureza longitudinal

Na análise da microdureza pode-se observar que não houve diferença estatística significativa entre os grupos estudados ($p > 0,05$), ou seja, todos apresentaram resultados semelhantes entre si. Pode-se observar que os grupos 1 e 3 apresentaram diminuição dos valores da microdureza e os grupos 2 e 4 um ligeiro aumento, mas sem representar diferença entre eles ($p > 0,05$).

Tabela 3: Média e desvio padrão (em %) da alteração da microdureza longitudinal nos diferentes grupos experimentais.

Grupos	Porcentagem da alteração (%)
G1 - HCl	88,26 ± 0,13 a
G2 - HCl + Pepsina	103,96±0,23 a
G3 - HCl + Bile	97,10±0,11 a
G4 - HCl + Pancreatina	109,95±0,20 a

*mesma letra similaridade estatística

Análise Morfológica

Na morfologia dos diferentes grupos (Figura 11 e 12) pode-se observar que o grupo 1 apresentou menor degrau, tendo a região interprismática bem erodida, expondo as cabeças dos prismas. O grupo 2 apresentou também um degrau menor, porém mais pronunciado que o grupo 1, tendo os prismas de esmalte mais expostos e com áreas de perdas de estruturas. No grupo 3 e 4 pode-se observar uma grande perda estrutural do esmalte exposto, com remoção intensa da região interprismática, com áreas amorfas.

Grupo 1: Área protegida / Área erodida – HCl
pH 2,0 - 37°C

Grupo 2: Área protegida / Área erodida – HCl
+ Pepsina pH 2,1- 37°C

Grupo 3: Área protegida / Área erodida – HCl +
Bile pH 3,0 - 37°C

Grupo 4: Área protegida / Área erodida - HCl
+ Pancreatina pH 3,0 - 37°C

Figura 11: Imagens ilustrativas dos diferentes grupos estudados onde se observa no grupo 1 e 2 um processo erosivo mais brando com pouca perda estrutural, por sua vez no grupo 3 e 4 pode se observar uma maior perda de esmalte (aumento – 107x).

Grupo 1: HCl pH 2,0 - 37°C

Grupo 2: HCl + Pepsina pH 2,1 - 37°C

Grupo 3: HCl + Bile pH 3,0 - 37°C

Grupo 4: HCl + Pancreatina pH 3,0 - 37°C

Figura 12: Imagens ilustrativas em detalhes do esmalte erodido pelas diferentes soluções, observa-se no grupo 1 e 2 um processo de desmineralização mais intenso na região interprismática, porém sem destruição da cabeça dos prismas. Nos grupos 3 e 4 as soluções afetaram mais intensamente o esmalte e destruíram também as cabeças dos prismas tendo áreas de esmalte amorfo (setas) (aumento 2131x).

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

A doença do refluxo gastroesofágico (DRGE) é considerada um fator determinante para a presença de erosão dental. Diversos estudos tem demonstrado a sua correlação (Farahmand et al, 2013; Roesch-Ramos et al, 2014), porém sem a completa elucidação do processo. Em alguns casos a erosão dental é o sinal clínico da DRGE mais evidente, podendo ser o cirurgião-dentista o primeiro profissional a suspeitar da doença (Lussi et al, 2011).

Sabe-se que os diferentes níveis de erosão dental são explicados principalmente pelo tempo e frequência de exposição ao ácido (Wiengand et al., 2007; Voronets; Lussi, 2010), porém pouco se sabe qual a influência do conteúdo do material refluído no processo erosivo. A grande perda de estrutura dental relacionada ao alto índice de DRGE tem despertado grande interesse no tema, existem na literatura inúmeros estudos que demonstraram o grande potencial erosivo do ácido clorídrico líquido (Barlett; Coward, 2001; Esteves-Oliveira et al., 2012; Wegehaupt et al., 2012, Derceli, 2014). Recentemente demonstrou-se que o ácido clorídrico em forma de gás também gera desmineralização por processo erosivo/corrosivo (Derceli, 2014).

Tanto o refluxo gástrico quanto o duodenal ocorrem frequentemente tanto em pacientes saudáveis como em portadores da DRGE (Hirano, 2006). Contudo, observa-se na literatura (Chen et al., 2013) uma concentração consideravelmente maior de bile no estômago de pacientes portadores da DRGE (26,4 mmol/L) frente a pacientes saudáveis (4,45 mmol/L). Na saliva de pacientes submetidos à cirurgia bariátrica a concentração de ácidos biliares encontrada variou de 0,5 a 5,0mmol/L (De Corso et al, 2007), o que poderia acarretar algum efeito aos tecidos bucais.

Desta forma é possível afirmar que o material de origem duodenal (bile e pancreatina) pode estar presente no conteúdo refluído à cavidade bucal, tanto em pacientes saudáveis como em portadores da DRGE (Sereg-Bahar et al, 2014). Porém pouco se sabe o efeito dessas substâncias sobre o esmalte dental, por tanto o objetivo do presente estudo foi estudar a influência da bile, a

pancreatina e a pepsina associada ao ácido clorídrico no agravamento do efeito erosivo.

Para que o esmalte dental seja atingido, o conteúdo duodenal passa através do estômago para o esôfago até finalmente atingir a cavidade bucal. O ácido clorídrico apresenta um grande potencial de erosão em esmalte (Bartlett et al, 2001) que acontece devido à perda de mineral para o meio ácido (Amaechi et al, 1998), posteriormente ocorre um aumento da rugosidade superficial (Nekrashevych; Stösser, 2003) seguida da diminuição da dureza (Voronets et al., 2008). Assim sendo, o HCl foi mantido em todas as soluções preparadas.

Para tanto se empregou a solução de ácido clorídrico como controle, pois já vem sendo bem estudado com resultados consistentes e demonstrando um processo erosivo constante e intenso. A pepsina é a enzima mais potente do suco gástrico, produzida pelas células do estômago e responsável pela transformação da proteína em peptídeo possibilitando sua absorção (Thiemann, 2014; Kondjoyan et al, 2015), seu pH mais ativo está entre 2,0 e 3,0 (Piper; Fenton, 1965) e torna-se inativa em $\text{pH} > 4,0$ (O'Reilly et al, 2015). Foi empregada, neste estudo, juntamente com a solução de HCl na proporção necessária para atingir o pH final de 2,1, visando manter a pepsina no seu pH mais ativo. *In vivo* a pepsina pode ser encontrada em concentrações que variam de 50µg/ml podendo chegar a 2200µg/ml. (Newton et al, 2004).

A fim de se comparar os efeitos do refluxo gastroesofágico com o refluxo duodeno-gastroesofágico foram estudadas outras duas soluções com adição de substâncias de origem duodenal. Foi determinado pH 3,0 visando simular a maioria dos casos de refluxo duodeno-gastroesofágico que ocorre em ambiente ácido com pH esofágico < 4 . (Vaezi; Richter, 1996). Foi empregada a bile, que é produzida pelo fígado e armazenada na vesícula biliar, no processo digestivo é responsável pela emulsificação de gordura (Netter, 2000; Thiemann, 2014) e adicionado bicarbonato de sódio a solução de HCl até atingir o pH 3,0. Na outra solução foi utilizada a pancreatina proveniente do suco pancreático e secretado pelo pâncreas, seu pH varia de 7,8 a 8,2 devido ao bicarbonato de sódio (Netter, 2000; Thiemann, 2014) que foi adicionado à solução juntamente com o

HCl até a obtenção de pH 3,0. Para manter as propriedades das soluções e do potencial de ação das enzimas as soluções foram preparadas diariamente e mantidas a 37°C. A quantidade de soluto foi determinada após testes preliminares que indicaram a saturação da solução. O bicarbonato de sódio também é secretado pelo pâncreas, no duodeno com o objetivo de neutralizar o bolo alimentar ácido proveniente do estômago possibilitando a ação das enzimas pancreáticas (Thiemann, 2014) e que também pode estar presente no refluxo duodenogástrico e neste estudo teve a função de adequar o pH.

Para avaliação das substâncias empregou-se o substrato bovino, estes foram empregados em substituição ao esmalte humano devido ao fato de apresentarem diversas similaridades entre si, além da facilidade na obtenção e composição mais homogênea (Mellberg, 1992). O esmalte bovino se assemelha ao humano na orientação dos prismas (Boyde, 1965), teor de cálcio (Davidson et al, 1973) e composição proteica (Fincham, 1980), Outro fator interessante desses substratos é a sua procedência, que é de animais destinados a abate todos com a mesma idade, tipo de alimentação e hábitos, facilitando a padronização.

No intervalo entre os desafios erosivos os espécimes foram mantidos em saliva artificial para a formação da película adquirida que acontece na cavidade bucal e ajuda na proteção do esmalte contra a erosão (Hannig; Joiner, 2006). Esta ciclagem vem sendo empregada para simular uma situação clínica e assim o presente estudo empregou uma situação que poderia ocorrer em casos de DRGE (Derceli, 2014).

Pode-se observar que as diferentes soluções apresentaram comportamentos distintos sendo que as soluções com bile levaram a uma erosão mais intensa, não havendo porém diferença estatística entre elas. O degrau e a rugosidade superficial apresentaram resultados que confirmam os obtidos na análise qualitativa, ambos foram maiores nos grupos 3, demonstrando assim uma maior destruição dos fragmentos dentais dos grupos que continham enzimas duodenais. Resultado semelhante foi observado por Higo et al (2009) que verificou uma destruição do elemento dental mais acelerada após a indução do refluxo duodenal em ratos, principalmente quando

ocorreu uma mistura dos conteúdos gástrico e duodenal (Higo et al, 2009). A ausência de outros estudos correlacionando a ocorrência de erosão dentária com as soluções analisadas no presente trabalho dificultaram sua discussão.

Contudo, foi possível observar que tanto a solução com bile como com pancreatina eram mais viscosas e mesmo após a lavagem ao final de cada desafio ainda ficava sobre a superfície um resíduo da solução, o que provavelmente intensificou o processo corrosivo do esmalte. A metodologia não teve a intenção de lavar intensamente a superfície ou friccionar algodão ou gaze visando não intensificar o processo erosivo, isso pode ter permitido esse acúmulo da substância gerando uma maior degradação superficial.

Em contra partida na análise da microdureza longitudinal o resultado não coincidiu com os citados anteriormente, em que todos os grupos apresentaram semelhança de valores. Foi observado apenas que no grupo controle (solução de ácido clorídrico) houve perda de dureza superficial, não ocorrendo o mesmo nos outros grupos. Esse fato sugere que, como a estrutura mais superficial foi perdida no processo de erosão, não foi possível a avaliação da microdureza deste tecido perdido, aparentemente não existe a penetração das soluções, sendo sua ação somente superficial, principalmente as soluções com bile e pancreatina, que se apresentaram mais viscosas e, portanto de difícil penetração pelos prismas. Sugere-se que a força da mastigação gera pequenas trincas no esmalte que possibilitam a penetração do ácido e diminuição da dureza em profundidade (Noma et al, 2007), como o presente estudo não associou o processo mastigatório não houve a ocorrência dessas trincas, e com isso houve limitação da penetração dos ácidos.

A ausência de estudos *in vitro* que visam simular o conteúdo duodenal dificultou a discussão dos resultados, tendo sido necessário a realização de estudos preliminares para a determinação da metodologia e das soluções a serem utilizadas. Contudo, os resultados do presente estudo observaram que a bile em associação ao HCl mostrou maior potencial erosivo em comparação ao HCl sozinho, ou seja, o refluxo duodenogástrico pode acelerar e intensificar a erosão dental causada pelo refluxo gastroesofágico, reforçando assim a necessidade de que o cirurgião-dentista esteja atento aos sinais e sintomas da

doença do refluxo, podendo ser ele, o primeiro a suspeitar da doença do refluxo gastroesofágico ou duodeno-gastroesofágico.

CONCLUSÃO

6. CONCLUSÃO

Baseado nos resultados obtidos pode-se concluir que:

A bile e a pancreatina, de origem duodenal, em associação com o ácido clorídrico promoveu uma maior alteração estrutural com maior degrau, aumento da rugosidade superficial e perda de anatomia prismática do esmalte.

REFERÊNCIAS

7. REFERÊNCIAS

1. Amaechi BT, Higham SM, Edgar WM. Use of transverse microradiography to quantify mineral loss by erosion in bovine enamel. *Caries Res.* 1998;32(5):351-6.
2. Bardhan KD, Strugala V, Dettmar PW. Reflux revisited: advancing the role of pepsin. *Int J Otolaryngol.* 2012;646901.
3. Bartlett DW, Coward PY. Comparison of the erosive potential of gastric juice and a carbonated drink in vitro. *J Oral Rehab.* 2001 Nov;28(11):1045-7.
4. Benages A, Muñoz JV, Sanchiz V, Mora V, Minguez M. Dental erosion as extraesophageal manifestation of gastro-esophageal reflux. *Gut* 2006;55:1050-1.
5. Boyde A. The structure of developing mammalian dental enamel. In: *Tooth Enamel.* Stack MV, Fearnhead RW. Bristol: Wright; 1965. p 163-92.
6. Carvalhaes A, Ferrari AP, Magalhães ANF, et al. Doença do refluxo gastroesofágico: diagnóstico. *Diretrizes Clínicas na Saúde Complementar.* Associação Médica Brasileira e Agência Nacional de Saúde Suplementar, 2009.
7. Chen TF, Yadav PK, Wu RJ, Yu WH, Liu CQ, Lin H, Liu ZJ. Comparative evaluation of intragastric bile acids and hepatobiliary scintigraphy in the diagnosis of duodenogastric reflux. *World J Gastroenterol.* 2013 Apr;19(14):2187-96.
8. Chinzon D. Manifestações extra-esofágicas e atípicas da DRGE. *Condutas Terapêuticas em Gastro* 2004;(03):31-4.
9. Coleman GC, Nelson JF. *Princípios de diagnóstico bucal.* Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan; 1996.329p.
10. Davidson CL, Boom G, Arends J. Calcium distribution in human and bovine surface enamel. *Caries Res* 1973;7:349-59.
11. De Corso E, Baroni S, Agostino S, Cammarota G, Mascagna G, Mannocci A, Rigante M, Galli J. Bile acids and total bilirubin detection in saliva of patients submitted to gastric surgery and in particular to subtotal Billroth II resection. *Ann Surg* 2007 Jun;245(6):880-5.
12. Dent J, El-Serag HB, Wallander MA, Johansson S. Epidemiology of gastro-oesophageal reflux disease: a systematic review. *Gut.* 2005 May;54:710-7.
13. Derceli JR. Análise *in vitro* e *in situ* da erosão dental e de métodos de prevenção em pacientes portadores da Doença do Refluxo

- Gastroesofágico [tese]. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2014.
14. Esteves-Oliveira M, Yu H, Eduardo CP, Meister J, Lampert F, Attin T, Wiegand A. Screening of CO₂ laser (10.6 µm) parameters for prevention of enamel erosion. *Photomed Laser Surg*. 2012 Jun;30(6):331-8.
 15. Farahmand F, Sabbaghian M, Ghodousi S, Seddighoraee N, Abbasi M. Gastroesophageal reflux disease and tooth erosion: a cross-section observation study. *Gut Liver*. 2013 Mai;7(3):278-81.
 16. Fein M. What is the prevalence of duodenogastroesophageal reflux in patients with gastroesophageal reflux disease. In: *The Duodenogastroesophageal Reflux: From the Dудenum to the Trachea 125 Questions-125 Answers*. John LibbeyEurotext Limited, Paris. 2006; 132-135.
 17. Fincham AG. Changing amino acid profiles of developing dental enamel in individual human teeth and the comparison of the protein matrix of developing human and bovine enamel. *Arch Oral Biol* 1980;25:669-74.
 18. Fuchs KH, Maroske J, Fein M, et al. Variability in the composition of physiologic duodenogastric reflux. *J Gastrointest Surg* 1999 Jul-Aug;3(4):389-96.
 19. Fujikawa H, Saijyo T, Ito S, Ii K. Studies of experimental model of reflux esophagitis in rats by ligature on both lower portion of duodenum and most of forestomach. *Nippon Shokakibyo Gakkai Zasshi*. 1994 Apr;91:829-38.
 20. Gandara BK, Truelove EL. Diagnosis and management of dental erosion. *J Contemporary Dent Pract* 1999;1(1):1-16.
 21. Gawron AJ, Hirano I. Advances in diagnostic testing for gastroesophageal reflux disease. *World J Gastroenterol*. 2010;16(30):3750-6.
 22. Gaynor EB. Laryngeal complications of GERD. *J Clin Gastroenterol*. 2000 Apr;30(3):S31-4.
 23. Goldberg HI, Dodds WJ, Gee S, Montgomery C, Zboralske FF. Role of acid and pepsin in acute experimental esophagitis. *Gastroenterology*. 1969 Feb;56(2):223-30.
 24. Hannig M, Joiner A. The structure, function and properties of the acquired pellicle. *Monogr Oral Sci*. 2006;19:29-64.
 25. Herbella FA, Patti MG. Gastroesophageal reflux disease: from pathophysiology to treatment. *World J Gastroenterol*. 2010;16(30):3745-9.
 26. Higo T, Mukaisho K, Ling ZQ, Oue K, Chen KH, Araki Y, Sugihara H, Yamamoto G, Hattori T. An animal model of intrinsic dental

- erosion caused by gastro-oesophageal reflux disease. *Oral Dis.* 2009 Jul;15(5):360-5.
27. Hirano I. Review article: modern technology in the diagnosis of gastro-oesophageal reflux disease--Bilitec, intraluminal impedance and Bravo capsule pH monitoring. *Aliment Pharmacol Ther.* 2006 Mar;23(Suppl)1:12-24.
 28. Jolly AJ, Wild CP, Hardie LJ. Acid and bile salts induce DNA damage in human oesophageal cell lines. *Mutagenesis* 2004 Jul;19(4):319-24.
 29. Kaminski EMF; Kruel CDP. Modelo de carcinogênese gástrica utilizando piloroplastia de Finney: estudo experimental em ratos. *ABCD, arq. bras. cir. dig. vol.24 no.4 São Paulo Oct./Dec. 2011*
 30. Kauer WK, Peters JH, DeMeester TR, Feussner H, Ireland AP, Stein HJ, Siewert RJ. Composition and concentration of bile acid reflux into the esophagus of patients with gastroesophageal reflux disease. *Surgery.* 1997 Nov;122(5):874-81.
 31. Kim TH, Lee KJ, Yeo M, Kim DK, Cho SW. Pepsin detection in the sputum/saliva for the diagnosis of gastroesophageal reflux disease in patients with clinically suspected atypical gastroesophageal reflux disease symptoms. *Digestion.* 2008;77(3–4):201-6
 32. Kondjoyan A, Daudin JD, Santé-Lhoutellier V. Modelling of pepsin digestibility of myofibrillar proteins and of variations due to heating. *Food Chem.* 2015 Apr;1;172:265-71.
 33. Kreulen CM, Van 't Spijker A, Rodriguez JM, Bronkhorst EM, Creugers NH, Bartlett DW. Systematic review of the prevalence of tooth wear in children and adolescents. *Caries Res.* 2010;44(2):151-9.
 34. Levitch LC, Bader JD, Shugars DA. Non-carious cervical lesions. *J Dent* 1994;22(4):195-207.
 35. Lussi A, Ganss C. Dental Erosion: Diagnosis, Risk Assessment, Prevention, Treatment. *Quintessence* 2011:3-18.
 36. Lussi A, Shlueter N, Rakhmatullina E, Ganss C. Dental erosion – an overview with emphasis on chemical and histopathological aspects. *Caries Res.* 2011;45(1):2-12.
 37. Marsicano JA, de Moura-Grec PG, Bonato RC, Sales-Peres Mde C, Sales-Peres A, Sales-Peres SH. Gastroesophageal reflux, dental erosion, and halitosis in epidemiological surveys: a systematic review. *Eur J GastroenterolHepatol.* 2013 Feb;25: 135–141.
 38. Masclee AA, de Best AC, de Graaf R, Cluysenaer OJ, Jansen JB. Ambulatory 24-hour pH-metry in the diagnosis of gastroesophageal reflux disease.Determination of criteria and relation to endoscopy.*Scand J Gastroenterol.* 1990 Mar;25(3):225-30.

39. Mason RJ, De Meester TR Importance of duodenogastric reflux in the surgical outpatient practice. *HepatoGastroenterol.* 1999; 46:48–53.
40. Mellberg JR. Hard-tissue substrates for evaluation of cariogenic and anti-cariogenic activity in situ. *J Dent Res* 1992; Apr;71:913-9.
41. Meurman JH, Toskala J, Nuutinen P, Klemetti E. Oral and dental manifestations in gastroesophageal reflux disease. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1994 Nov;78(5):583-9.
42. Nekrashevych Y. Stösser L. Protective influence of experimentally formed salivary pellicle on enamel erosion. An in vitro study. *Carie Res.* 2003 Mai-Jun;37(3):225-31.
43. Netter FH. *Atlas de Anatomia Humana.* 2ed. Porto Alegre. Artmed, 2000.
44. Newton JL, James OF, Williams GV, Allen A. The diurnal profile of gastric pepsin activity is reduced with *Helicobacter pylori* infection. *Dig Dis Sci.* 2004 Aug;49:1103-8.
45. Noma N, Kakigawa H, Kozono Y, Yokota M. Cementum crack formation by repeated loading in vitro. *J Periodontol.* 2007 Abr;78(4):764-9.
46. O'Reilly RC, Soundar S, Tonb D, Bolling L, Yoo E, Nadal T, Grindle C, Field E, He Z. The Role of Gastric Pepsin in the Inflammatory Cascade of Pediatric Otitis Media. *JAMA Otolaryngol Head Neck Surg.* 2015 Jan.
47. Orel R, Vidmar G. Do acid and bile reflux into the esophagus simultaneously? Temporal relationship between duodenogastro-esophageal reflux and esophageal pH. *Pediatr Int.* 2007 Apr;49:226-31.
48. Piper DW, Fenton BH. pH stability and activity curves of pepsin with special reference to their clinical importance. *Gut.* 1965 Oct;6(5):506–8.
49. Ranjitkar S, Kaidonis JA, Smales RJ. Gastroesophageal reflux disease and tooth erosion. *Int J Dent.* 2012; 2012: 479850.
50. Rapôso NML, Cruz MCFN, Lopes FF. Erosão dentária como uma lesão oral predominante na doença do refluxo gastroesofágico. *Rev. bras. odontol., Rio de Janeiro, v. 67, n. 2, p.152-6, jul./dez. 2010.*
51. Roesch-Ramos L, Roesch-Dietlen F, Remes-Troche JM, Romero-Sierra G, Mata-Tovar Cde J, Azamar-Jácome AA, Barranca-Enríquez A. Dental erosion, an extraesophageal manifestation of gastroesophageal reflux disease. The experience of a center for digestive physiology in Southeastern Mexico. *Rev Esp Enferm Dig.* 2014 Feb;106(2):92-7.
52. Sanioto DV, Mello-Aires M. *Sistema Digestivo. Fisiologia.* 1 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999, v. 1, p. 665, 671-672.
53. Scheutzel P. Etiology of dental erosion--intrinsic factors. *Eur J Oral Sci.* 1996 Apr;104:178-90.

54. Sereg-Bahar M, Jerin A, Jansa R, Stabuc B, Hocevar-Boltezar I. Pepsin and bile acids in saliva in patients with laryngopharyngeal reflux - a prospective comparative study. *Clin Otolaryngol*. 2014 Dec 16.
55. Sifrim D, Blondeau K. Technology insight: The role of impedance testing for esophageal disorders. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol*. 2006 Apr;3(4):210-9.
56. Sifrim D, Zerbib F. Diagnosis and management of patients with reflux symptoms refractory to proton pump inhibitors. *Gut*. 2012 Sep;61:1340-54.
57. Spechler SJ. Epidemiology and natural history of gastro-oesophageal reflux disease. *Digestion*. 1992;51(Suppl)1:24-9.
58. Stein HJ, Kauer WK, Feussner H, Siewert JR. Bile acids as components of the duodenogastric refluxate: detection, relationship to bilirubin, mechanism of injury and clinical relevance. *Hepatogastroenterology* 1999 Jan-Feb;46(25):66-73.
59. Thiemann O. Sistema digestivo [internet]. 2014. Disponível em: <http://biologia.ifsc.usp.br/bio2/apostila/apost-fisiol-parte4.pdf>.
60. Tibbling GL, Blackadder L, Franzén T, Kullman E. Gastric bile monitoring: An in vivo and in vitro study of Bilitec reliability. *Scand J Gastroenterol*. 2002 Nov;37(11):1334-7.
61. Vaezi MF, Richter J. Role of acid and duodenogastric reflux in gastroesophageal reflux disease. *Gastroenterology* 1996 Nov;111:1192-9.
62. Vaezi MF, Singh S, Richter JE. Role of acid and duodenogastric reflux in esophageal injury: a review of animal and human studies. *Gastroenterology* 1995;108:1897-907.
63. Valena V, Young WG. Dental erosion patterns from intrinsic acid regurgitation and vomiting. *Aus Dent J*. 2002 Jun;47(2):106-15.
64. Velanovich V. Gastroesophageal reflux disease and the airway-essentials for the surgeon. *World J Gastrointest Surg*. 2009;1(1):8-10
65. Voronets J, Jaeji T, Buergin W, Lussi A. Controlled toothbrush abrasion of softened human enamel. *Caries Res*. 2008;42(4):286-90.
66. 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.
67. Wegehaupt FJ, Tauböck TT, Sener B, Attin T. Long-term protective effect of surface sealants against erosive wear by intrinsic and extrinsic acids. *J Dent*. 2012 May;40(5):416-422.
68. Wiengand A, Kowing L, Attin T. Impact of brushing force on abrasion of acid-softened and sound enamel. *Arch Oral Biol*. 2007 Nov;52(11):1043-7.

69. Young WG. The oral medicine of tooth wear. Aust Dent J 2001 Dec;46(4):236-50.