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

JULIANA DOS REIS DERCELI

*Análise in vitro e in situ da erosão dental e de métodos de prevenção
em pacientes portadores da Doença do Refluxo Gastroesofágico*

Ribeirão Preto
2014

JULIANA DOS REIS DERCELI

*Análise in vitro e in situ da erosão dental e de métodos de prevenção
em pacientes portadores da Doença do Refluxo Gastroesofágico*

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

Programa: Odontologia Restauradora

Área de Concentração: Odontologia Restauradora

Opção: Dentística

Orientadora: Prof^a Regina Guenka Palma Dibb

Versão corrigida

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.

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

Derceli, Juliana dos Reis

Análise *in vitro* e *in situ* da erosão dental e de métodos de prevenção em pacientes portadores da Doença do Refluxo Gastroesofágico. Ribeirão Preto, 2014.

155 p. : il. ; 30 cm

Tese de Doutorado (Versão corrigida da Tese. 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

Folha de Aprovação

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 apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutora em Ciências. Programa: Odontologia Restauradora. Área de Concentração: Odontologia Restauradora. Opção Dentística. Ribeirão Preto, 2014.

Data da Aprovação: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Dedicatória

Dedicatória

Este Trabalho é Dedicado à:

*À Deus que me permitiu percorrer este caminho, sempre me guiando e
iluminando.*

*Aos meus amados pais Ana Dalva e João Batista, que diante de tantas
dificuldades, dedicaram o melhor de suas vidas a mim e às minhas
irmãs. Os que me incentivam a melhorar a cada dia e a buscar o certo.
Não há palavras para expressar o amor e a gratidão.*

Meus amores, minha vida.

*Às minhas amadas irmãs Luciana e Giovana, que sempre estiveram ao
meu lado, me dando força, apoio e amor. Em cada uma, em sua
individualidade, consigo ver um pouco de mim.*

*Ao meu esposo Felipe, que tornou a minha vida completa, meu melhor
amigo, meu companheiro, minha vida.*

*À minha avó materna e mãe Tereza, por todo amor, carinho,
ensinamentos e dedicação.*

*À minha linda sobrinha Monique, que há sete anos ilumina minha
vida e me enche de alegrias.*

*À minha avó paterna Maria por todo amor e ao meu avô paterno
Isídro, que hoje não se encontra mais entre nós, obrigada por todo o
amor.*

*A minha querida sogra Ana Maria, que sempre me apoiou e acreditou
no meu sucesso.*

*Aos meus cunhados Alexandre, Luciano, Letícia e Ricardo, por
fazerem parte da nossa família e trazer alegrias a todos.*

Agradecimiento
Especial

Agradecimento Especial

À professora Regina Guenka Palma Dibb, que me auxiliou em minha jornada, sempre me ensinando e orientando. Profissional e mãe exemplar. Grande professora, pesquisadora e orientadora. Pessoa que me inspira. Agradeço todos os conselhos, todo o apoio e incentivo. Uma longa jornada que seguimos juntas, da qual lembrarei com muitas saudades.

Agradecimientos

Agradecimentos

Agradeço à Deus e à minha família, pela vida e pelas oportunidades que pude desfrutar.

Agradeço aos meus tios, tias e primos que estiveram sempre presentes em minha vida.

Ao meu esposo Felipe, pela compreensão nos momentos difíceis, pelo apoio incondicional e por todo amor. Te amo!

À minha amiga Juliana Jendiroba Faraoni Romano, pela amizade e por toda ajuda. Pessoa iluminada, sempre disposta a ajudar a todos. Sempre alegre e positiva. Obrigada por todo o apoio.

Aos meus amigos de laboratório, que fizeram meus dias mais alegres e me ajudaram em muitos momentos, agradeço pela amizade e companheirismo: Carmen Torres Toro, Julia Olien Sanchez, Renata Siqueira Scatolin, Taísa Penazzo Lepri, César Penazzo Lepri, Walter Raucchi Neto, Julia Barone, Kelly Machado de Andrade, Sandra Shiga, Camila Scatena.

Aos colegas de pós graduação: Dinah Ribeiro Amoras, Vasti Claro de Araújo, Rodrigo Alexandre Valério, Késsia Suênia Fidelis de Mesquita, Yamba Carla Lara Pereira, Ira Cristina Uekama, Cíntia Guimarães de Almeida, Vinícius Rangel Geraldo Martins, Talitha de Siqueira Melara, Jaciara Miranda Gomes da Silva.

À FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), que desde a graduação tem auxiliado meu desenvolvimento na pesquisa e na área acadêmica através de incentivos por meio de bolsas de Iniciação Científica, bolsa de Treinamento Técnico e bolsa de Doutorado. Agradeço pela oportunidade e confiança no meu trabalho.

À Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, representado pelo Diretor Professor Dr. Valdemar Mallet da Rocha Barros e pela Vice-Diretora Prof^a Dr^a Léa Assed Bezerra da Silva.

À coordenação geral de 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 da Universidade de São Paulo, pessoa do Prof. Dr. Manoel Damiano de Souza Neto.

Ao chefe de 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 Comissão de Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, na pessoa da Prof^a. DR^a. Maria Cristina Borsatto.

Aos professores membros da minha banca de exame de qualificação: Prof^a Dr^a Regina Guenka Palma Dibb, Prof. Dr. César Penazzo Lepri, Prof. Dr. César Bataglioni. Agradeço a contribuição para a finalização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. César Bataglioni, pelo auxílio prestado durante todo o desenvolvimento do projeto.

À todos os voluntários que participaram deste estudo, e possibilitaram sua concretização. Meus sinceros agradecimentos.

À técnica Patrícia Marchi, pela amizade e auxílio durante o desenvolver deste trabalho.

À Débora Fernandes Costa Guedes, técnica do Laboratório de Gerenciamento de Resíduos Odontológicos da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo e Alessandro Dibb, por toda ajuda no desenvolvimento da metodologia deste trabalho.

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

À todos os funcionários do Departamento de Odontologia Restauradora da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

Ao Carlos Feitosa dos Santos, secretário do curso de Pós-Graduação do Departamento de Odontologia Restauradora da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, pela amizade e solicitude.

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

Ao Prof. Dr. Ricardo Brandt de Oliveira da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo e à Dr^a Lílían Rose

Otoboni Aprile, médica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, pelo apoio no desenvolvimento deste estudo.

Aos professores e técnicos do Laboratório de Caracterização Estrutural DEMa da Universidade Federal de São Carlos que contribuíram para o desenvolvimento deste estudo

À Prof^a Dr^a Cristina Kurachi e à técnica Natália Mayumi Inada do Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo, pela contribuição no desenvolvimento do trabalho.

Aos amigos pessoais que sempre estiveram ao meu lado, Fabiano Jeremias, Flávia Volpato, Natali Costa, Paulo Gustavo, Tatiane Tardivo, Naiana Viola, Giovanne Nicolí, Pérola Saito, Gislaine Pires, Flávia Mamede, Luciana Bordignon, obrigada por fazerem parte da minha história.

Aos meus colegas e amigos do curso de graduação da Faculdade de Odontologia de Araraquara da Universidade Estadual Paulista.

Aos meus professores do curso de graduação da Faculdade de Odontologia de Araraquara da Universidade Estadual Paulista.

Epígrafe

“Dizem que a vida é para quem sabe viver, mas ninguém nasce pronto. A vida é para quem é corajoso o suficiente para se arriscar e humilde o bastante para aprender”

Clarice Lispector

Resumo e Abstract

Resumo

O objetivo deste estudo foi avaliar *in vitro* o efeito do ácido clorídrico na forma líquida e gasosa na superfície do esmalte, além de avaliar diferentes tratamentos preventivos. Avaliar *in situ* a influência da Doença do Refluxo Gastroesofágico (DRGE) sobre o esmalte dental e, avaliar a eficiência de tratamentos preventivos contra a erosão dental em ambiente bucal. Os tratamentos realizados na fase *in situ* do estudo foi totalmente dependente dos resultados da fase *in vitro*. Para a fase *in vitro*, foram obtidos 234 espécimes de esmalte (4X4 mm) a partir de incisivos bovinos, os mesmos foram isolados com resina composta, exceto pela metade da superfície de esmalte, a qual foi exposta aos tratamentos preventivos e/ou desafios erosivos. Esta etapa do estudo foi fatorial 3 X 3, tendo como fatores de estudo: Tratamento superficial em 3 níveis: ausência de tratamento (C), laser de CO₂ (CO) e laser Nd:YAG (Nd); e a associação à fluoretos em 3 níveis: sem associação (SA), associado ao flúor gel (AF) e associado ao verniz fluoretado (AVF). Os desafios erosivos foram realizados de duas formas, HCl líquido e HCl gasoso. Foram selecionados 180 espécimes tratados (n=10) e distribuídos aleatoriamente. O desafio erosivo com HCl líquido foi realizado sob pH=2, à 37 °C, 6 X ao dia, durante 20s e por 5 dias; o desafio com HCl gasoso foi realizado sob pH=2, à 37 °C, 8 X ao dia, durante 3 min e por 12 dias. As análises foram realizadas em função do perfil de desgaste, degrau, perda de volume e rugosidade de superfície. Para as análises das alterações químicas e morfológicas da superfície, foram selecionados 54 espécimes divididos aleatoriamente de acordo os tratamentos preventivos propostos e de acordo com as seguintes análises (n=3): DRX e MEV-EDS. Os dados foram submetidos ao teste estatístico de análise de variância (ANOVA) a dois critérios, os dados referentes ao DRX e EDS foram avaliados de forma descritiva e as imagens da MEV foram avaliadas qualitativamente. Resultados HCl líquido - observou-se que o subgrupo VF aumentou o perfil de desgaste (média e desvio padrão: 0,82±0,17) em relação ao C (0,66±0,14). Para a interação dos fatores, os subgrupos C/AVF e Nd/AVF apresentaram aumento do perfil de desgaste (0,84±0,21; 0,86±0,12), C (0,70±0,10); o VF aumento da rugosidade (0,26±0,06), C (0,22±0,07). Entretanto, para a interação dos fatores, CO e C/AF apresentaram melhores resultados (0,19±0,07; 0,18±0,03), C (0,21±0,07); para o degrau e perda de volume não houve diferença estatisticamente significativa. Resultados HCl gasoso - observou-se que o grupo Nd (1,3±0,08) proporcionou menor perfil de desgaste e

Nd/AF ($1,8 \pm 0,51$) maior desgaste em relação ao controle ($C1,4 \pm 0,16$); a associação F e VF proporcionou menor degrau ($6,6 \pm 4,9$; $8,9 \pm 3,8$), rugosidade ($0,35 \pm 0,07$; $0,37 \pm 0,05$) e perda de volume ($6,0 \pm 3,3$; $8,3 \pm 3,6$) em relação ao controle ($C11,86 \pm 4,3$; $0,41 \pm 0,04$; $11,05 \pm 4,7$; respectivamente). Na análise de EDS houve diminuição do conteúdo de flúor para os tratamentos C, C/AF, C/AVF, CO/AVF, Nd/AF e Nd/AVF e a proporção Ca/P não foi alterada; para o DRX não observou-se alteração no conteúdo de flúor. Não observou-se alterações morfológicas na superfície do esmalte nas imagens capturadas em MEV. A fase *in situ* contou com a participação de 44 voluntários divididos nos seguintes grupos: Controle (n=10) - saudável; Suspeita (n=17) - com erosão dental e sintomas de DRGE; DRGE (n=17) - diagnosticados com a doença e em tratamento. Foram obtidos 264 espécimes de esmalte bovino ($2 \times 2 \times 2$ mm), os quais foram impermeabilizados com resina composta, exceto pela metade da superfície de esmalte que foi submetida aos tratamentos preventivos e expostas ao meio bucal. O estudo foi fatorial de 3×2 , sendo: Tratamento superficial em 3 níveis: ausência de tratamento (C), laser de CO_2 (CO) e laser Nd:YAG (Nd); e a associação à fluoretos em 2 níveis: sem associação (SA) e associado ao flúor gel (AF). Composta por 2 fases de 30 dias, com intervalo de 7 dias entre cada fase. Os dados foram submetidos ao teste estatístico de análise de variância (ANOVA) a dois critérios. Os resultados foram nulos (0) para o perfil, degrau, perda de volume e rugosidade; o grupo CO quando exposto na cavidade bucal levou à formação de trincas na superfície. Pode-se concluir no estudo *in vitro* que o ácido clorídrico na forma líquida e gasosa causa erosão dental, entretanto com comportamentos distintos. Para o HCl líquido o subgrupo CO/AF proporcionou menor desgaste, para o HCl gasoso a associação ao F e VF diminuiu o desgaste. Os tratamentos não proporcionaram aumento do conteúdo de flúor na superfície do esmalte. No estudo *in situ* conclui-se que o período de 30 dias em meio bucal de pacientes portadores de DRGE são insuficientes para causar erosão no esmalte, os estudos *in vitro* e *in situ* apresentam resultados divergentes entre si, sendo necessário mais estudos na área. O laser de CO_2 causa trincas no esmalte dental exposto ao meio bucal.

Abstract

The aim of this *in vitro* study was to evaluate the effect of the liquid and gaseous hydrochloric (HCl) acid on enamel surface of different preventive treatments. To evaluate *in situ* the influence of the gastroesophageal reflux disease (GERD) on dental enamel and the efficiency of preventive treatments against dental erosion in the oral environment. For *in situ* study, the superficial treatments were selected according to the *in vitro* study results. For *in vitro* study 234 enamel samples (4x4 mm) were obtained from bovine incisors and isolated with the composite resin, except half of the enamel surface which was exposed to preventative treatments and erosive challenges. The experimental layout was a 3 X 3 factorial. The factors under study were Superficial treatment in 3 levels: no treatment (C), CO₂ laser (CO) and Nd:YAG laser (Nd); and Fluoride/Laser association in 3 levels: without association (WA), fluoride gel association (FA) and fluoride varnish association (FVA). Erosive challenges were performed using liquid and gaseous HCl. 180 treated specimens were selected (n=10) and randomly assigned. Erosive challenge using liquid HCl - pH=2, 37°C, 6 times/day, during 20s, for 5 days; erosive challenge using gaseous HCl - pH=2, 37 °C, 8 times/day, during 3 min, for 12 days. It was evaluated wear depth (profilometer), step, volume loss and surface roughness. For the chemical and surface morphology analysis, 54 specimens were selected and randomly divided according to the preventive treatments (n=3): XRD and SEM-EDS. Data were analyzed by two-way ANOVA. XRD and EDS was performed data descriptive analysis and SEM was analyzed qualitatively. Liquid HCl results – FV association presented higher wear depth (median and standard deviation: 0.82±0.17) compared to C (0.66±0.14). In the interaction between C/FVA and Nd/FVA increased wear depth (0.84±0.21; 0.86±0.12), C (0.70±0.10); the factor FV increased the roughness (0.26±0.06), C (0.22±0.07); the interaction between CO and C/FA were better (0.19±0.07; 0.18±0.03), C (0.21±0.07); For step and volume loss are not significantly different. Gaseous HCl results - Nd presented lower wear depth (1.3±0.08) and Nd/FA higher wear depth (1.8±0.51), C (1.4±0.16); F and VF association presented lower step (6.6±4.9; 8.9±3.8), roughness (0.35±0.07; 0.37±0.05) and volume loss (6.0±3.3; 8.3±3.6), C (11.86±4.3; 0.41±0.04; 11.05±4.7; respectively). For EDS analysis there was decrease fluoride content after the treatments C, C/FA, C/FVA, CO/FVA, Nd/FA and Nd/FVA; ratio Ca/P was not

altered. For XRD was not observed fluoride content changes. It was not observed morphological change by SEM. For *in situ* study, 44 volunteers were selected and divided into groups: Control (n=10) - healthy; Suspect (n=17) - dental erosion and GERD symptoms; GERD (n=17) - with disease diagnosis. 264 specimens were obtained from bovine incisors (2x2x2 mm), which were isolated with the composite resin except half of the enamel surface which was exposed to preventive treatments and oral cavity. The study was factorial 3X2: Superficial treatments in 3 levels: no treatment (C), CO₂ laser (CO) and Nd:YAG laser (Nd); and fluoride association in 2 levels: without association (WA) and fluoride gel association (FA), in 2 phases of 30 days and 7-day interval between each phase. Data were analyzed by two-way ANOVA. The results were null (0) for wear depth, degree, volume loss and roughness; CO group exposed to oral cavity promoted superficial cracks. *In vitro* study - it can be concluded that liquid and gaseous hydrochloric acid promoted dental erosion. For liquid HCl CO/FA promoted lower wear depth; for gaseous HCl F and VF association decreased wear depth, the treatments do not alter fluoride content on enamel surface. *In situ* study - 30-day period in the oral environment is insufficient to cause enamel erosion in GERD patients, *in vitro* and *in situ* studies show divergent results between themselves and thus more studies are needed. The CO₂ laser causes cracks on enamel exposed to the oral environment.

Sumário

Sumário

<i>Resumo e Abstract</i>	<i>XXVII</i>
<i>1. Introdução</i>	<i>37</i>
<i>2. Proposição</i>	<i>47</i>
<i>3. Material e Método</i>	<i>51</i>
<i>3.1. Estudo in vitro</i>	<i>53</i>
<i>3.2. Estudo in situ</i>	<i>79</i>
<i>3.3. Análise dos Dados</i>	<i>84</i>
<i>4. Resultados</i>	<i>85</i>
<i>4.1. Estudo in vitro</i>	<i>87</i>
<i>4.2. Estudo in situ</i>	<i>105</i>
<i>5. Discussão</i>	<i>111</i>
<i>6. Conclusões</i>	<i>123</i>
<i>7. Referências Bibliográficas</i>	<i>127</i>
<i>Anexo 1</i>	<i>141</i>
<i>Anexo 2</i>	<i>145</i>
<i>Anexo 3</i>	<i>149</i>
<i>Anexo 4</i>	<i>153</i>

Introdução

1. Introdução

A Doença do Refluxo Gastroesofágico (DRGE) é, atualmente, a doença gastrointestinal mais comum (Sandler et al., 2002; Shaheen et al., 2006), de caráter crônico com grande prevalência na população em geral (Lemme, 2003; Sifrim; Zerbib, 2012), cerca de 11% da população brasileira apresenta sintomas compatíveis com DRGE (Chinzon, 2004). Cerca de 1/3 da população de países industrializados é afetada por esta doença (Meurman et al., 1994), acometendo em maiores proporções a população ocidental (El-Seraq, 2007).

A DRGE é definida como uma afecção crônica e recidivante, decorrente do fluxo retrógrado de parte do conteúdo gastroduodenal para o esôfago ou órgãos adjacentes a ele, acarretando um espectro variável de sintomas e/ou sinais esofagianos e/ou extra-esofagianos associados ou não a lesões teciduais (Lemme, 2003; Tutuian et al., 2008). Pessoas saudáveis, possuem uma barreira anti-refluxo funcional, apresentando poucos episódios de refluxo ácido (Kaye, 1977), sendo estes considerados fisiológicos, entretanto, sujeitos portadores da DRGE apresentam muitos episódios de refluxo (Schindlbeck et al., 1987; Masclee et al., 1990), sugerindo ineficiência dessa barreira (Dent et al., 1988).

Os sinais e sintomas típicos da doença são a pirose e/ou regurgitação (Rodrigues et al., 1999), entretanto, a ausência de sintomas típicos não exclui o diagnóstico, uma vez que, outras manifestações relacionadas ao refluxo gastroesofágico têm sido descritas e consideradas como manifestações atípicas (sintomas extra-esofágicos), sendo estas a dor retroesternal, a disfagia, asma, tosse, bronquite, pneumonias de repetição, rouquidão, pigarro, sinusite crônica, otalgia, erosão dental, xerostomia, aftas e halitose (Gaynor, 2000).

O material refluído pode ser composto por líquido, gás ácido e a mistura líquido-gás (Sifrim; Blondeau, 2006), sendo a presença do gás ácido o mais frequente durante os episódios de refluxo (Sifrim 1999; van Wijk et al., 2009). O desenvolvimento e a utilização de nova tecnologia possibilitou novas formas de avaliação da DRGE, a impedânciometria possibilitou detectar e monitorar a presença do gás durante os

episódios de refluxo e associá-lo aos sintomas (Sifrim et al., 2001; Emerenziani et al., 2008; Tutuian et al., 2008).

Estudos (Sifrim et al., 1999; Clarke et al., 2008) comprovam a existência de gás durante os episódios de refluxo, sendo considerado um fator agravante dos sintomas dolorosos da DRGE (Bredenoord et al., 2005; Emerenziani et al., 2008), por produzir mais rápida e maior distensão do esôfago (Tutuian et al., 2008) e aumentar a percepção dos episódios de refluxo pelos pacientes (Emerenziani et al., 2008).

A grande maioria dos episódios de refluxo ocorre acompanhado de eructação (Barham et al., 1995), através da qual o gás é eliminado (Sifrim et al., em 2001). O gás chega à cavidade bucal com maior facilidade quando comparado ao líquido, pois o mesmo é expelido juntamente com a respiração ou na forma de eructação (Tutuian et al., 2008). O material líquido refluído dificilmente chega à cavidade bucal em pacientes com DRGE, na maioria dos casos o mesmo fica contido na região do esôfago (Woodland; Sifrim, 2010). Desta forma, pode-se supor que o HCl líquido não é o único responsável pela erosão dental, sendo provavelmente o gás oriundo do suco gástrico o fator mais importante (Higo et al., 2009) por estar presente na cavidade bucal com tamanha frequência. Entretanto, é desconhecido o efeito do gás ácido sobre o esmalte dental.

Por outro lado, os efeitos danosos do refluxo líquido sobre o esmalte são conhecidos (Esteves-Oliveira et al., 2012; Wegehaupt et al., 2012; Farahmand et al., 2013), sendo este composto, principalmente, por ácido clorídrico e pepsina (Kim et al., 2008) e possuir pH próximo à 2,3 (Valena;Young, 2002), este fato pode gerar um processo de desmineralização crônico, até a perda substancial de estrutura, ou seja, capaz de causar a erosão dental (Meurman; ten Cate, 1996). Neste caso, este processo é de origem intrínseca, a qual é causada pelo ácido clorídrico presente no suco gástrico, o qual alcança a cavidade bucal através do vômito ou da regurgitação em casos de bulimia e refluxo gastroesofágico (Imfeld, 1996; Bartlett; Coward, 2001).

A erosão dental também pode apresentar causas extrínsecas e estar relacionada à ingestão de alimentos e bebidas ácidas, às substâncias químicas presentes no meio ambiente como em indústrias químicas e piscinas cloradas ou pelo uso de medicamentos como vitamina C e aspirina (ten Cate; Imfeld, 1996; Hefferren, 2004).

Trata-se de uma lesão, onde ocorre perda localizada, crônica e/ou patológica de tecido mineral que é removido quimicamente da superfície do dente por meio de substâncias ácidas, quelantes e alcalinas, sem o envolvimento de bactérias e de caráter irreversível (Benages et al., 2006). Clinicamente os dentes erodidos apresentam áreas com perda de brilho do esmalte e de aspecto liso, são lesões largas e rasas sem ângulo nítido.

A região cervical é, normalmente, a mais afetada em função da ineficiente autolimpeza e com isso as substâncias ácidas permanecem neste local por um período mais prolongado, também se deve considerar a escassez da saliva nesta região que também contribui para o processo erosivo, pois a mesma não atuará na normalização do pH (Eccles, 1979). Estas lesões são também denominadas de lesões cervicais não cariosas (Grippe; Masi, 1991). Em dentes restaurados, as restaurações tornam-se proeminentes, projetando-se acima da superfície dental. Quando acomete a dentina provoca sensibilidade ao frio, ao calor e à pressão osmótica (Levitch et al., 1994).

As diferentes características das lesões causadas pelos fatores intrínsecos e extrínsecos são bem definidas. As lesões erosivas por fatores intrínsecos, normalmente, estão localizadas na face palatina de dentes anteriores e/ou face oclusal na maxila e mandíbula (Gandara; Truelove, 1999). Em dentes anteriores inferiores é raro o aparecimento destas lesões, devido à presença da língua nesta região e também pelo grande fluxo de saliva secretada pelas glândulas sublinguais e submandibulares, garantindo a proteção dos dentes (Cebrián-Carretero; López-Arcas-Calleja, 2006). No caso das lesões de origem extrínseca, as mesmas localizam-se com maior frequência na face vestibular do terço cervical dos dentes anteriores (Coleman; Nelson, 1996).

Alguns autores (McCoy et al., 1982; Grippe; Masi 1991; Noma et al., 2007) relatam que para haver lesões com perda de substrato dental, deve haver uma tríade, onde há a associação de fatores como abfração, abrasão e erosão, ou seja, sem a associação destes fatores não há o início e/ou progressão da lesão. Sugerem que a força oclusal gera microtrincas no esmalte e estas propiciam a penetração das substâncias ácidas e o início do processo erosivo.

Desta forma, diante do aumento considerável de lesões erosivas no esmalte dental, muitos estudos (Nammour et al., 2003; Arnold et al., 2006; Derceli et al., 2013) vem sendo realizados na tentativa de aumentar a resistência do esmalte e da dentina às substâncias ácidas e muitas estratégias têm sido desenvolvidas para a sua prevenção, dentre elas tem-se a aplicação tópica de flúor (Johanson et al., 2004). A aplicação de altas concentrações de flúor, na forma de gel e vernizes tem demonstrado diminuir o desenvolvimento de lesões erosivas (Rios et al., 2009).

Contudo, alguns estudos (Hove et al., 2006; Magalhães et al., 2011) demonstraram limitado efeito do fluoreto de sódio na prevenção da erosão. Este fato pode ser atribuído à fraca ligação do íon fluoreto ao íon cálcio, a qual permite com muita facilidade que o íon fluoreto seja perdido em meio bucal por troca, difusão e migração para a saliva (Featherstone, 2000a), levando a uma redução do seu conteúdo em um curto período de tempo, sendo importante a aplicação tópica de flúor frequente para modificar as propriedades do esmalte e manter a taxa de flúor alta em meio bucal (Cury, 2002).

Desta forma, outros tratamentos têm sido estudados para a prevenção da erosão dental. A irradiação laser (Ana et al., 2006) tem demonstrado aumentar a resistência ácida do esmalte (Fried et al., 1996). O laser tem sido utilizado em muitas áreas da saúde, na odontologia podem ser utilizados no clareamento dental (Akin et al., 2013), no processo inflamatório, na desinfecção intra-canal (Mohammadi et al., 2013), na remoção de tecido cariado (Toro et al., 2013; Kita et al., 2014), no tratamento de hipersensibilidade dentinária (Lopes et al., 2013), na prevenção da cárie e da erosão dental (Ana et al., 2006).

Há uma grande variedade de lasers como o Er:YAG, Er-Cr:YSGG, Argônio, CO₂ e Nd:YAG que estão sendo avaliados para essa finalidade (Powell et al., 1993), sendo os melhores resultados relacionados aos lasers Nd:YAG e CO₂ (Kimura et al., 1987; Tsai et al., 2002; Corrêa-Afonso et al., 2013a). O laser CO₂ tem demonstrado ser o mais eficiente no aumento da resistência ácida (Ana et al., 2006) devido ao seu comprimento de onda que coincide com o coeficiente de absorção da hidroxiapatita, a qual possui forte banda de absorção na região do infravermelho, graças à presença do fosfato, carbonato e grupos hidroxila (OH⁻) (Fowler et al., 1986).

O laser Nd:YAG foi o primeiro laser a ser estudado como método de prevenção de cárie dental em 1972 (Sten; Sognnaes) e, desde então tem sido relatado como um

eficiente tratamento preventivo contra a cárie e a erosão dental (Bedini et al., 2010; Corrêa-Afonso et al., 2013a), entretanto sua baixa absorção pela água e pela hidroxiapatita permitia sua transmissão para o tecido pulpar, desta forma os parâmetros utilizados devem ser conhecidos para o emprego seguro do laser.

A interação do laser com o tecido dental depende dos parâmetros do mesmo, como o comprimento de onda, a emissão dos pulsos, a duração dos pulsos, a energia, a frequência e os métodos de irradiação, mas também depende das propriedades ópticas do tecido irradiado como a capacidade de absorção, refração, difusão e reflexão, o que irá ditar os efeitos do laser sobre o tecido. A absorção é o fenômeno mais desejado, pois é através deste que a energia laser é transformada em calor sendo capaz de promover alterações nas estruturas dentais (Featherstone, 2000b).

O laser, quando utilizado como método preventivo da cárie ou da erosão dental, pode causar alterações na superfície do esmalte de modo a torná-lo menos solúvel em meio ácido. Para tanto, a densidade de energia do laser deve ser selecionada de forma a causar efeitos térmicos na superfície que aumentem a sua resistência e não causem a ablação (Featherstone; Fried, 2001). O aumento da temperatura em torno de 100 a 300 °C causa a desidratação e carbonização das proteínas e dos lipídeos (Parker, 2007); as temperaturas acima de 400 °C decompõem o carbonato presente no esmalte, tornando a hidroxiapatita menos solúvel; a temperatura em torno de 800 a 1200 °C causa fusão e transformação do esmalte (Fried et al., 1997).

A irradiação laser forma áreas de fusão, recristalização e vitrificação do esmalte. Acredita-se que a fusão do esmalte gerada pela rápida elevação da temperatura superficial, promove o aumento do tamanho dos cristais de apatita e, consequentemente, o aumento da resistência ácida da estrutura dental (Ying et al., 2004; Fried et al., 1996; Castellan et al., 2007). Entretanto esta fusão não é homogênea, ocorrendo em áreas restritas da superfície (Ferreira et al., 1989).

Outros estudos (Ying et al., 2004; Maung et al., 2007a) demonstraram que a fusão seguida pela recristalização não é a única maneira de aumentar a resistência ácida do esmalte, ocorre também a diminuição da permeabilidade do esmalte, a diminuição do volume dos poros e da área de superfície, a remoção parcial da matriz orgânica (Hsu et al., 2000; Maung et al., 2007b), a diminuição do conteúdo de água e carbonatos (Holcomb; Young, 1980; Corrêa-Afonso et al., 2012 e 2014), a formação

de pirofosfato e a decomposição de proteínas (Fowler et al., 1986), que também contribuem para menor susceptibilidade do substrato à erosão dental após a irradiação laser.

O principal mecanismo de aumento da resistência ácida está associada à eliminação de carbonato, uma vez que, o mesmo compõe a apatita carbonatada que é um mineral mais solúvel (Fowler et al., 1986). Estudo *in vitro* (LeGeros, 1999) demonstrou que a incorporação dos íons carbonato à hidroxiapatita diminui o tamanho dos cristais, além da ligação do cálcio ao carbonato (Ca-CO_3) ser mais fraca em relação à ligação do cálcio ao fosfato (Ca-PO_4), desta forma há a diminuição da resistência ácida.

A associação da aplicação tópica de flúor à irradiação laser tem sido relatada como tentativa de maximizar o efeito dos dois métodos (sinergismo entre os tratamentos) (Tagliaferro et al., 2007; Rios et al., 2009; Azevedo et al., 2012; Steiner-Oliveira et al., 2010; Derceli et al., 2013). Alguns estudos (Fox et al., 1992), relatam que o pH de dissolução do esmalte diminui após a associação do laser ao fluoreto, uma vez que, o pH de dissolução do esmalte é de 5,5, após a irradiação laser diminui para 4,8, e após a associação do laser ao fluoreto o pH reduz para 4,3, graças ao sinergismo existente entre ambos.

Existem algumas teorias para este sinergismo, acredita-se que a irradiação laser causa alterações químicas e morfológicas no substrato dental (Tagliaferro et al., 2007; Esteves-Oliveira et al., 2009), gerando micro espaços que funcionam como armazenamento de fluoreto de cálcio (Gao et al., 2006) quando o mesmo é aplicado sobre a superfície. Outra hipótese, fala sobre a possibilidade do fluoreto de cálcio presente na superfície ser incorporado à estrutura do esmalte após o processo de fusão e recristalização promovido pela irradiação laser (Goodman; Kaufman, 1977; Meurman et al., 1997; Phan et al., 1999). Porém, o mecanismo de ação ainda é desconhecido e os resultados são controversos (Ana et al., 2006; Azevedo et al., 2012; Derceli et al., 2013).

Assim, apesar da alta incidência de lesões erosivas na população atual, os tratamentos são controversos e não se tem um protocolo de prevenção para estes tipos de lesões. Associado a este fato, tem havido grande incidência da Doença do Refluxo Gastroesofágico e, conseqüentemente, aumento da ocorrência de erosão

dental. Embora haja muitos relatos sobre o refluxo gasoso, ainda é desconhecida sua ação sobre o substrato dental, o que dificulta ainda mais um tratamento preventivo-intervencionista. Desta forma, torna-se necessário desenvolver tratamentos preventivos que tornem o esmalte dental mais resistente à erosão ácida causada pela DRGE e também conhecer os efeitos do gás ácido sobre o mesmo.

Proposição

2. *Proposição*

Os objetivos do presente estudo foram:

- Avaliar *in vitro* o efeito do ácido clorídrico, na forma líquida e gasosa na superfície do esmalte dental, além de avaliar diferentes tratamentos preventivos por meio das análises de perfil de desgaste, degrau, perda de volume e rugosidade de superfície e, avaliar possíveis alterações químicas e morfológicas na superfície do esmalte dental após a realização dos tratamentos preventivos por meio da difratometria de raio X, espectrometria de energia dispersiva de raio X e microscopia eletrônica de varredura.

- Avaliar *in situ* a influência da Doença do Refluxo Gastroesofágico sobre o esmalte dental e avaliar a eficiência dos tratamentos preventivos contra a erosão dental, por meio das análises de perfil de desgaste, degrau, perda de volume e rugosidade de superfície após exposição em meio bucal de pacientes com Doença do Refluxo Gastroesofágico diagnosticada e em pacientes com suspeita da doença.

Material e Método

3. *Material e Método*

Este estudo foi desenvolvido em duas etapas. Primeiramente, foi realizado o estudo *in vitro* para analisar o potencial erosivo do ácido clorídrico líquido e gasoso na superfície do esmalte dental e avaliar a eficiência de diferentes tratamentos preventivos e suas alterações sobre o mesmo. O estudo *in situ* foi realizado de acordo com os resultados do estudo *in vitro*, ou seja, os tratamentos preventivos mais eficientes observados no estudo *in vitro* foram utilizados no estudo *in situ* e levados à cavidade bucal de voluntários.

3.1. *Estudo in vitro*

Delineamento experimental

O estudo *in vitro* avaliou o efeito erosivo do ácido clorídrico na forma líquida e gasosa sobre o esmalte dental, simulando o que ocorre na cavidade bucal de pacientes portadores da DRGE, também foi avaliado o efeito de diferentes tratamentos preventivos realizados sobre o mesmo.

Esta etapa do estudo foi fatorial 3 X 3, tendo como fatores de estudo: tratamento superficial em 3 níveis: ausência de tratamento (C), laser de CO₂ (CO) e laser Nd:YAG (Nd); e a associação aos fluoretos em 3 níveis: sem associação (SA), associado ao flúor gel (AF) e associado ao verniz fluoretado (AVF). Os desafios erosivos foram realizados de duas formas, HCl líquido e HCl gasoso, sendo estas analisadas separadamente seguindo o estudo fatorial acima. As unidades experimentais foram 234 espécimes de esmalte bovino divididos aleatoriamente nos grupos experimentais.

O estudo foi realizado de acordo com um delineamento em blocos completos casualizados. As variáveis de resposta quantitativa para o estudo *in vitro* foram o perfil de desgaste, o degrau, a rugosidade de superfície, a perda de volume, a espectrometria de energia dispersiva de raio X e a análise da difratometria de raio X. A microscopia eletrônica de varredura foi utilizada para análise qualitativa da

superfície do esmalte e para ilustrar as possíveis alterações morfológicas ocorridas após a realização dos tratamentos preventivos.

Obtenção dos Espécimes

Foram empregados incisivos bovinos limpos (Figura 1) e armazenados, previamente, em solução de formol a 2% e pH 7,0. Os dentes com presença de trincas, rachaduras, manchas hipoplásicas ou acentuado desgaste foram descartados. Inicialmente, 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 obtidos os espécimes de esmalte nas dimensões de 4x4 mm (Figura 1).

Em seguida, os espécimes foram fixados em cilindros de resina acrílica para a realização da planificação e polimento da superfície 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, disco de feltro e suspensão de alumina de 0,3 e 0,05 µm (Arotec S/A Ind. e Comércio, São Paulo/SP, Brasil) (Figura 1). 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.

Os espécimes foram submetidos ao teste de microdureza para seleção amostral. Para tanto, os mesmos foram fixados com cera escultura (Asfer Indústria Química Ltda., São Caetano do Sul – SP, Brasil) a uma base de acrílico com o auxílio de um paralelômetro (ElQuip, São Carlos-SP, Brasil) de forma a deixar a superfície de esmalte paralela à placa. Para a análise de microdureza, foi utilizado o microdurômetro Shimadzu Micro Hardness Tester HMV-2.000 (Shimadzu Corporation – Kyoto-Japan) com penetrador diamantado piramidal tipo Knoop, com carga estática de 25 g/f, aplicada por 10 segundos (Figura 1).

Foram realizadas, em cada amostra, cinco indentações sendo a primeira a 2 mm de uma das bordas do espécime e entre cada indentação foi deixado espaço de 500 µm. Em seguida, foi calculada a média de dureza de cada espécime, 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 10% do valor de sua própria média.

Foram selecionados 180 espécimes de esmalte dental, divididos aleatoriamente de acordo com os grupos e subgrupos. Após os tratamentos os espécimes foram divididos aleatoriamente, sendo 90 espécimes para os desafios erosivos com HCl líquido (n=10) e 90 espécimes para desafios erosivos com HCl gasoso (n=10), de acordo com os tratamentos superficiais realizados.

Figura 1: Obtenção dos espécimes – A) Incisivo bovino. B) Coroa separada da raiz ilustrando os cortes que foram realizados. C) Lixa d'água e alumina utilizadas para planificação e polimento da superfície. D) Espécime obtido após os cortes, planificação e polimento. E) realização da microdureza superficial.

Impermeabilização dos Espécimes

A impermeabilização foi realizada com o objetivo de cobrir todas as faces do espécime com resina composta, exceto pela metade da superfície de esmalte que foi mantida exposta para a realização dos tratamentos preventivos e/ou aos desafios erosivos. A metade da superfície do esmalte coberta por resina composta foi tomada como área referência (Figura 2).

A impermeabilização foi realizada com finas camadas de resina composta (Filtek™ Z350, cor A1, 3M ESPE, USA), a qual foi cuidadosamente acomodada sobre as faces dos espécimes com o auxílio de uma espátula para resina (Suprafill nº1, Duflex, SSWhite, Inglaterra) sem a aplicação de sistema adesivo (Amaechi & Higham, 2001) e fotopolimerizadas (fotopolimerizador Ultraled, Dabi Atlante, Ribeirão Preto, Brasil) por 20 segundos (Figura 2). Cada face do espécime foi impermeabilizada individualmente.

Figura 2: A- resina composta sendo fotopolimerizada; B- espécime isolado com resina composta.

Grupos Experimentais

Após a seleção das amostras, as mesmas foram aleatoriamente divididas em três grupos (n=30) e então em três subgrupos (n=10), conforme descrito abaixo:

Grupos Experimentais

C: controle (sem tratamento)

CO: Irradiação com laser CO₂

Nd: Irradiação com laser Nd:YAG

Subgrupos Experimentais

SA: Sem associação de tratamentos

AF: Associado ao flúor gel

AVF: Associado ao verniz fluoretado

Tratamentos Realizados

Os espécimes foram tratados de acordo com os seus grupos/subgrupos da seguinte maneira:

- Grupo C – controle
 - ✓ Sem a aplicação de laser.
- Grupo CO – Irradiação com laser CO₂.
 - ✓ Para o tratamento dos espécimes experimentais com laser CO₂ foi empregado o equipamento PC015-A (Shanghai Jue Hua Laser Tech. Development Co., Ltd., Shanghai, China) que possui um comprimento de onda de 10,6 µm e diâmetro do feixe de 0,3 mm. O equipamento de laser foi utilizado com potência de 0,8 W, no modo não-contato, duty time 0,12 s, idle time 0,10 s, 20 Hz, densidade de potência de 1.132,34 W/cm² e sob refrigeração a água. A distância entre a lente de saída do laser e o alvo foi de 2,5 mm e o tempo de aplicação sobre o esmalte de 15 segundos (Figura 3). A irradiação foi realizada manualmente, sendo realizada a varredura da superfície.

- Grupo Nd – Irradiação com laser Nd:YAG
 - ✓ Para o tratamento dos espécimes experimentais com laser Nd:YAG foi empregado o equipamento Smart File (Deka, Calenzano, Itália) em modo contato através de uma fibra de quartzo de 0,3 mm, a qual foi posicionada perpendicularmente à amostra. O equipamento apresenta comprimento de onda de 1,064 μm , pulso extra long e sob refrigeração a água. A energia utilizada foi de 100 mJ com frequência de 10 Hz, densidade de potência de 1.415,43 W/cm² totalizando 1 W de potência e o tempo de aplicação sobre o esmalte de 15 segundos (Figura 3). A irradiação foi realizada manualmente, sendo realizada a varredura da superfície.
- Subgrupo F – Aplicação de flúor gel
 - ✓ O flúor gel (flúor fosfato acidulado 1,23%, DFL Indústria e Comércio S.A. Rio de Janeiro/RJ, Brasil) foi aplicado sobre a superfície de esmalte com auxílio de um microbrush por um período de 4 minutos e removido após este período com auxílio de gaze (Figura 4).
- Subgrupo VF – Aplicação do verniz fluoretado
 - ✓ O verniz fluoretado (Duraphat - fluoreto de sódio a 5%, Colgate-Palmolive, Alemanha) foi aplicado na superfície de esmalte em duas camadas com auxílio de um microbrush, a camada de verniz foi deixada sobre a superfície do esmalte por 24 horas e removida com gaze após este período (Figura 5).
- CO/AF e Nd/AF – Associação dos lasers ao gel fluoretado.
 - ✓ O flúor gel foi aplicado sobre superfície de esmalte e após 1 minuto os lasers foram irradiados por 15 segundos sobre o flúor gel, após completar 4 minutos da sua aplicação, o mesmo foi cuidadosamente removido com gaze (Figura 6).

- CO/AVF e Nd/AVF - Associação dos lasers ao verniz fluoretado
 - ✓ O verniz fluoretado foi aplicado sobre a superfície de esmalte e após 1 minuto os lasers foram irradiados por 15 segundos, os espécimes foram armazenados em água destilada e após 24 horas o verniz fluoretado foi removido com gaze (Figura 6).

Figura 3: A) laser de CO₂. B) laser de Nd:YAG.

Figura 4: Aplicação do flúor gel

Figura 5: Aplicação do verniz fluoretado.

Figura 6: Irradiação laser. A) Irradiação sobre o gel fluoretado. B) Irradiação sobre o verniz fluoretado.

Desafios Erosivos

Em estudos preliminares foram definidas a concentração e o pH das soluções de HCl utilizados nos desafios erosivos, bem como o tempo de exposição necessário para causar alterações na superfície dos espécimes.

Dessa forma, os protocolos determinados para os desafios erosivos foram os seguintes:

- **HCl na forma líquida:** cada espécime foi exposto a 5ml de solução de HCl, com $\text{pH} \cong 2,0$, 0,1 M, concentração de 0,3% e à 37 °C. Os espécimes foram expostos ao ácido 6 vezes ao dia, pelo período de 20 segundos (sob agitação), durante 5 dias, sendo a solução de HCl trocada a cada desafio (Figura 7). Entre os desafios erosivos os espécimes ficaram armazenados em saliva artificial (Amaechi et al., 1999) à 37 °C por 1 hora. A saliva artificial foi trocada diariamente ao final dos desafios.

Figura 7: Esquema dos desafios erosivos em HCl líquido

- **HCl na forma gasosa:** os espécimes foram expostos ao gás com $\text{pH} \cong 2,0$, à 37°C , com períodos de exposição de 3 minutos, 8 vezes ao dia, durante 12 dias e intervalo entre um desafio e outro de 1 hora (Figura 8). Nos intervalos dos desafios os espécimes ficaram armazenados em saliva artificial à 37°C . A saliva artificial foi trocada diariamente ao final dos desafios.

Para a obtenção do ácido clorídrico na forma gasosa nas condições desejadas de pH e temperatura, foi desenvolvido um dispositivo para manter o sistema estável. Para obter o gás com $\text{pH} \cong 2,0$, à 37°C , a solução de HCl foi aquecida a cerca de 60°C . O sistema foi mantido fechado durante os desafios, o pH controlado com auxílio de fita papel indicador de pH (Acilit[®], Merck KGaA, Darmstadt, Germany) e a temperatura por meio de termômetro acoplado ao dispositivo. A solução de HCl foi trocada diariamente para garantir as condições ideais do gás.

distância em micrometros entre a linha média do gráfico (referente à área referência) e a linha de desgaste (área erodida) (Figura 9). Os dados, em μm , foram obtidos por meio de um software específico.

Figura 9: Imagem adquirida em microscópio confocal a laser ilustrando as 10 mensurações do perfil de desgaste.

Para a análise do degrau, sobre a imagem adquirida foram realizadas 10 leituras desde a borda da área hígida (referência) até o ponto mais baixo da área erodida (Figura 10). Os dados, em μm , foram obtidos por meio de um software específico.

Figura 10: Imagem adquirida em microscópio confocal a laser. A) ilustrando as 10 mensurações do degrau; B) ilustrando o degrau formado e a forma de obtenção dos dados.

O volume perdido em relação à área referência foi analisada através da imagem tridimensional dos espécimes. Os dados, em μm^3 , foram obtidos por meio de um software específico (Figura 12).

Figura 12: Imagem da análise de perda de volume, a área de cor rosa representa o tecido dental perdido.

Para a análise de rugosidade foram realizadas 10 leituras na área hígida (referência) e 10 leituras na área erodida (Figura 11). Os dados, em μm , foram obtidos por meio de um software específico.

Figura 11: Imagem adquirida em microscópio confocal a laser, ilustrando as 10 mensurações da rugosidade superficial na área referência e 10 na área erodida.

Para as análises das alterações químicas e morfológicas do esmalte dental após os tratamentos preventivos, foram selecionados 27 espécimes ($n=3$) para microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectrometria de energia dispersiva de raio X (EDS) e 27 espécimes para a difração de raio X (DRX) ($n=3$), os quais foram divididos aleatoriamente nos tratamentos preventivos propostos, nestes espécimes não foram realizados os desafios erosivos.

Preparo dos Espécimes para a Análise de MEV/EDS

Os 27 espécimes foram divididos aleatoriamente, isolados com resina composta, sendo que a metade da superfície do esmalte foi deixada exposta para receber os tratamentos preventivos (n=3). Após a realização dos tratamentos superficiais, a resina composta foi removida e os espécimes foram preparados de acordo com o seguinte protocolo:

- aplicação de gel de EDTA por 1 minuto;
- lavagem abundante com spray ar/água destilada;
- limpeza em ultra-som (Ultrasonic Cleaner T – 1449 – D, Odontobrás Indústria e Comércio, Ribeirão Preto – SP, Brasil) em 2 ciclos de 5 minutos em água deionizada, sendo os espécimes lavados em água deionizada entre os dois ciclos;
- desidratação dos espécimes através da embebição dos mesmos em diferentes concentrações de etanol (Labsynth Ltda., Diadema, SP, Brasil) por um período pré-determinado (25% por 20 minutos, 50% por 20 minutos, 75% por 20 minutos, 90% por 30 minutos e 100% por 1 hora) (Figura 13).

Para a análise das superfícies de esmalte em MEV e EDS (Philips- FEG, Laboratório de Caracterização Estrutural do DEMa – LCE – DEMa / UFsCAR-SP, Brasil), os mesmos foram fixados em *stub* com fita adesiva de carbono dupla-face (Electron Microscopy Sciences, Washington, EUA) e a cobertura com ouro foi realizada em aparelho de metalização a vácuo (SDC 050, Bal-Tec AG, Foehrenwg 16, Balzers, Alemanha) (Figura 14). Foi realizada a varredura de toda a superfície do espécime e o EDS realizado com aumento de 500x na região mais representativa do espécime e, em seguida, fotografada a área mais representativa de cada grupo em diferentes aumentos.

Figura 13: Esquema da desidratação dos espécimes em etanol.

Figura 14: Esquema dos espécimes fixados no *stub* para análise de MEV.

Preparo dos Espécimes para a Análise de DRX

Para a análise de DRX os 27 espécimes foram aleatoriamente divididos ($n=3$) e preparados da seguinte maneira: toda a dentina foi removida por meio de politriz e lixa d'água de granulação 600 e 1200, tomando-se o cuidado de manter 1 mm de espessura de esmalte. Desta forma as dimensões dos espécimes foi de 4x4x1 mm.

Objetivando analisar as alterações químicas causadas pelos tratamentos preventivos, os mesmos foram realizados nas duas faces do espécime. Após 24 horas os espécimes de esmalte foram lavados em água deionizada, colocados em ultrassom e água deionizada para lavagem por 5 minutos, foram secos com gaze, triturados com

auxílio de gral e pistilo e armazenados em recipiente limpo para posteriormente ser realizado a análise de DRX em difratômetro de raios-X RIGAKU (Geigerflex), equipado com tubo alvo de cobre (Laboratório de Caracterização Estrutural do DEMa – LCE – DEMa / UFSCar-SP, Brasil), com comprimento de onda da radiação $K\alpha$ do cobre de 1,54056 Å, potência de 40 kV, 25 mA e fendas de 1 mm no tubo e no detector.

3.2. *Estudo in situ*

Delineamento experimental

Esta etapa do projeto de pesquisa, foi enviada ao Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo seres humanos da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto-USP, sendo aceito pelo mesmo (Processo nº 2010.1.543.58.8) (anexo 1 – Aprovação CEP).

O estudo *in situ* apresentou delineamento cruzado (crossover), randomizado e duplo cego, dividido em 2 fases de 30 dias, com intervalo de 7 dias entre cada fase. O estudo foi fatorial de 3X2, sendo: tratamento superficial em 3 níveis: ausência de tratamento (C), laser de CO₂ (CO) e laser Nd:YAG (Nd); e a associação aos fluoretos em 2 níveis: sem associação (SA), associado ao flúor gel (AF). Estes tratamentos foram selecionados de acordo com o estudo *in vitro*, onde observou-se melhores resultados na associação dos lasers ao gel fluoretado.

Foram selecionados 44 voluntários para o estudo, sendo de ambos os sexos e faixa etária entre 18 e 60 anos, os quais constituíram 3 grupos: Controle (n=10) - pacientes sem sinais e sintomas de DRGE; Suspeita (n=17) - pacientes com erosão dental e sintomas da DRGE, porém sem diagnóstico médico; DRGE (n=17) - pacientes com DRGE diagnosticada, que estavam em tratamento para a doença e com presença de erosão dental.

Em cada voluntário foram cimentados o total de 6 espécimes de esmalte dental, os quais foram utilizados por 30 dias. As variáveis de resposta quantitativa foram o perfil de desgaste (μm), o degrau (μm), a rugosidade de superfície (μm) e a perda de volume (μm^3).

Obtenção dos Espécimes

A obtenção dos espécimes foi realizada de forma similar ao estudo *in vitro*, exceto pela dimensão dos mesmos, que para o estudo *in situ* apresentaram dimensões de 2x2x2 mm. Após o teste de microdureza Knoop foram selecionados 264 espécimes, os quais foram distribuídos aleatoriamente entre os grupos. Os espécimes foram esterilizados em óxido de etileno antes de serem impermeabilizados e cimentados na cavidade bucal dos voluntários.

Impermeabilização dos Espécimes

A impermeabilização dos espécimes foi realizada com resina composta da mesma maneira que foi realizada no estudo *in vitro*.

Grupos Experimentais

No estudo *in situ* foram utilizados os tratamentos preventivos selecionados de acordo com o estudo *in vitro*, sendo estes:

Grupos

C: Controle (sem tratamento)

CO: Irradiação com laser CO₂

Nd: Irradiação com laser Nd:YAG

Subgrupos

SA: Sem associação

AF: Associado ao flúor gel

Tratamentos Realizados

Os tratamentos foram realizados de acordo com a metodologia utilizada no estudo *in vitro*, exceto pelo tempo de irradiação dos lasers CO₂ e Nd:YAG, os quais foram irradiados por 10 segundos sobre a superfície dos espécimes.

Seleção dos Voluntários

Os voluntários foram selecionados na Clínica Médica do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto e na Clínica de Dor Orofacial na Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, sendo de ambos os gêneros, sem distinção de raça, na faixa etária de 18 a 60 anos. Os participantes receberam informações sobre a pesquisa, assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo 2 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido) e responderam a um questionário de diagnóstico da DRGE envolvendo os sinais e os sintomas da doença (anexo 3 - Ficha Clínica para diagnóstico da DRGE).

Foram selecionados voluntários adultos considerando-se os seguintes critérios de exclusão: fumante, presença de lesões de cárie ativa, utilização atual ou recente de medicamentos que afetam o fluxo salivar, tratamento de radioterapia ou quimioterapia, praticante de atividades aquáticas, presença de doença periodontal, desdentados, presença de doenças sistêmicas, fluxo salivar estimulado menor que 1ml/min e não estimulado menor que 0,1ml/min, pacientes diabéticos, bulímicos e anoréxicos.

Os voluntários foram submetidos a um exame clínico para a detecção de cárie ativa, doença periodontal e a testes salivares. Caso houvesse a existência de pequenas lesões de cárie e necessidade de remoção de biofilme ou de cálculo dental, estes tratamentos foram realizados antes do início do estudo. Os voluntários foram distribuídos nos seguintes grupos:

- Controle (n=10) - composto por pacientes que não apresentavam nenhum distúrbio gastrointestinal e sem sinais de erosão dental.
- Suspeita (n=17) - composto por pacientes que apresentam erosão dental e sintomas que caracterizam a DRGE, porém sem diagnóstico médico.
- DRGE (n=17) - composto por pacientes com erosão dental, diagnosticados com DRGE e que estavam em tratamento médico.

Todos os pacientes do grupo DRGE, obrigatoriamente, deveriam estar em tratamento com Omeprazol 10mg de uma a duas vezes por dia.

Cimentação dos espécimes

Os espécimes foram divididos em dois blocos, sendo estes, os que foram tratados com flúor (C/AF, CO/AF, Nd/AF) e os que não foram tratados com flúor (C, CO, Nd). Desta maneira, os espécimes que receberam os tratamentos superficiais não associados ao gel fluoretado não tiveram contato com os íons fluoretos oriundos dos tratamentos associados ao gel fluoretado. Cada bloco foi utilizado por 30 dias, havendo um intervalo de 7 dias de utilização entre um bloco e outro (wash out).

Os espécimes foram cimentados de forma aleatória na face palatina dos dentes 15, 16, 25 ou 26 (Figura 15). Para a realização da cimentação, a face palatina dos dentes selecionados foi higienizada com taça de borracha e pasta profilática. Após lavado e seco, foi aplicado ácido fosfórico 37% gel (Dentsply, Petrópolis, Rio de Janeiro) por 30 segundos e lavados com jato de água/ar.

Após a secagem com jato de ar e isolamento relativo da área com rolete de algodão, os espécimes foram cimentados com cimento resinoso RelyX U200 (3M ESPE, Brasil). O cimento foi colocado na superfície do dente e do espécime, em seguida, o espécime foi acomodado na superfície dental e realizada a fotopolimerização em todas as faces do espécime (fotopolimerizador DB 686, Dabi Atlante, Brasil) por 20 segundos. O cimento resinoso foi espatulado de acordo com as especificações do fabricante (Faraoni-Romano et al., 2009).

Após a cimentação foi avaliada a existência de contato entre os espécimes (Figura 15) e a oclusal dos dentes antagonistas por meio de fita de papel carbono, em caso de haver contato, foi realizado um leve desgaste da resina ao redor do espécime, por meio de alta rotação e ponta diamantada.

Após 30 dias os espécimes foram removidos com auxílio de um alicate de ortodontia para remoção de braquetes (346C, Ice, Brasil) e armazenados em água deionizada em congelador até a realização das análises.

Cada voluntário foi orientado a preencher uma tabela diária de alimentação (anexo 4 – Tabela de alimentação semanal), na qual deveriam constar os alimentos e bebidas ácidas consumidas durante o dia. Esta medida foi tomada como forma de monitorar a alimentação dos voluntários e sua possível interferência no padrão de desmineralização da erosão do esmalte.

Figura 15: Imagem ilustrando os espécimes de esmalte fixados na face palatina dos molares e pré-molares e sem contato oclusal com o dente antagonista.

Análises Realizadas

Após os tratamentos preventivos e exposição dos espécimes ao meio bucal, a resina composta isolante foi removida delicadamente com auxílio de um alicate, expondo a área referência. Os espécimes foram avaliados quanto ao perfil de desgaste, o degrau, a perda de volume e a rugosidade da superfície por meio da aquisição de imagens em microscópio confocal a laser LEXT OLS4000®. A metodologia para estas análises foi a mesma utilizada no estudo *in vitro*.

3.3. *Análise dos Dados*

A análise dos dados se deu da seguinte maneira:

Estudo in vitro

Para as análises de perfil de desgaste, degrau, perda de volume e rugosidade de superfície, após a análise dos dados, observou-se que a distribuição foi normal e homogênea. Desta forma, os dados foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA) a dois critérios (Tratamento e Associação) $p < 0,05$ e para diferenciação das médias empregou-se o teste de Tukey com $\alpha = 5\%$. Para as análises de EDS e DRX foi realizada a análise descritiva dos dados. As imagens capturadas através da MEV foram analisadas qualitativamente e comparadas entre os grupos.

Estudo in situ

Para as análises de perfil de desgaste, degrau, perda de volume e rugosidade de superfície, após a análise dos dados, observou-se que a distribuição foi normal e homogênea. Desta forma, os dados foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA) a dois critérios (Tratamento e Associação) $p < 0,05$.

Resultados

4. Resultados

4.1. Estudo *in vitro*

Desafio Erosivo em HCl Líquido

De acordo com a análise dos dados do perfil de desgaste, pode-se notar que os tratamentos superficiais não apresentaram diferença estatística entre si, ou seja, não proporcionaram efeito no processo erosivo. No fator associação, observou-se que o VF apresentou maior desgaste e estatisticamente diferente dos demais ($p < 0,05$) (Figura 16). A Tabela 1 apresenta a média e o desvio padrão dos diferentes grupos/subgrupos estudados. Pode-se observar que na análise da interação dos fatores ocorreu diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre C/AVF e Nd/AVF que apresentaram os maiores valores de desgaste em relação aos outros tratamentos.

Figura 16: Perfil de desgaste dos espécimes expostos ao HCl líquido de acordo com os tratamentos realizados e a associação de fatores (mesma letra indica similaridade estatística - $p > 0,05$).

Tabela 1: Média (em μm) e desvio padrão da interação dos fatores para a análise de perfil de desgaste dos espécimes expostos aos desafios erosivos em HCl líquido.

	C	CO	Nd
SA	0,70 $\pm$ 0,10 ab	0,60 $\pm$ 0,11 a	0,70 $\pm$ 0,18 ab
AF	0,60 $\pm$ 0,09 a	0,72 $\pm$ 0,15 ab	0,66 $\pm$ 0,10 ab
AVF	0,84 $\pm$ 0,21 b	0,74 $\pm$ 0,17 ab	0,86 $\pm$ 0,12 b

Mesma letra indica similaridade estatística $p>0,05$

Para a análise do degrau formado na superfície dos espécimes observou-se que não houve diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos ($p>0,05$), independentemente da associação ou não aos fluoretos (Figura 17) e na interação dos fatores (Tabela 2).

Figura 17: Degrau formado nos espécimes expostos ao HCl líquido de acordo com os tratamentos realizados e a associação dos fatores (mesma letra indica similaridade estatística - $p>0,05$).

Tabela 2: Média (em μm) e desvio padrão da interação dos fatores para a análise de degrau dos espécimes expostos aos desafios erosivos em HCl líquido.

	C	CO	Nd
SA	12,8 $\pm$ 1,2 a	13,3 $\pm$ 1,1 a	11,8 $\pm$ 2,0 a
AF	12,7 $\pm$ 0,8 a	13,3 $\pm$ 2,6 a	13,2 $\pm$ 1,3 a
AVF	12,8 $\pm$ 1,7 a	12,4 $\pm$ 1,8 a	12,1 $\pm$ 2,0 a

Mesma letra indica similaridade estatística $p>0,05$

Na rugosidade superficial dos espécimes observou-se que os tratamentos não apresentaram diferença estatística entre si ($p>0,05$). Para o fator associação, o VF proporcionou maior rugosidade de superfície (Figura 18) e diferente estatisticamente ($p<0,05$) dos demais grupos. Na interação dos fatores pode-se observar que houve diferença estatisticamente significativa ($p<0,05$) entre os grupos/subgrupos CO e C/AF em relação ao C/AVF, o qual ocasionou maior rugosidade (Tabela 3).

Figura 18: Rugosidade de superfície dos espécimes expostos ao HCl líquido de acordo com os tratamentos realizados e a associação dos fatores (mesma letra indica similaridade estatística - $p>0,05$).

Tabela 3: Média (em μm) e desvio padrão da interação dos fatores para a análise de rugosidade de superfície dos espécimes expostos aos desafios erosivos em HCl líquido.

	C	CO	Nd
SA	0,22±0,07ab	0,18±0,03a	0,26±0,08ab
AF	0,19±0,07a	0,22±0,04ab	0,24±0,04ab
AVF	0,29±0,09b	0,25±0,02ab	0,23±0,03ab

Mesma letra indica similaridade estatística $p>0,05$

Para a perda de volume do esmalte na superfície dos espécimes não houve diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos ($p>0,05$). O mesmo pode ser observado no fator associação (Figura 19) e na interação dos fatores (Tabela 4). A figura 20 mostra imagens da superfície de esmalte erodida pelo HCl líquido.

Figura 19: Perda de volume dos espécimes expostos ao HCl líquido de acordo com os tratamentos realizados e a associação dos fatores (mesma letra indica similaridade estatística - $p>0,05$).

Tabela 4: Média (em μm^3) e desvio padrão da interação dos fatores para a perda de volume dos espécimes expostos aos desafios erosivos em HCl líquido.

	C	CO	Nd
SA	9,10 $\pm$ 1,4 a	9,50 $\pm$ 1,2 a	9,80 $\pm$ 2,1 a
AF	9,50 $\pm$ 1,5 a	10,1 $\pm$ 1,8 a	10,1 $\pm$ 1,9 a
AVF	10,3 $\pm$ 1,4 a	9,80 $\pm$ 1,9 a	10,2 $\pm$ 1,6 a

Mesma letra indica similaridade estatística $p>0,05$

Figura 20: Imagens tridimensionais dos espécimes demonstrando as lesões de erosão na superfície de esmalte ocasionadas pelo HCl líquido.

Desafio Erosivo em HCl Gasoso

Analisando o perfil de desgaste, observou-se que não houve diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos ($p>0,05$). O mesmo pode-se observar no fator associação (Figura 21), entretanto na interação dos fatores verificou-se que o Nd proporcionou menor desgaste e diferente estatisticamente ($p<0,05$) do Nd/AF que proporcionou maior desgaste (Tabela 5).

Figura 21: Perfil de desgaste dos espécimes expostos ao HCl gasoso de acordo com os tratamentos (mesma letra indica similaridade estatística - $p>0,05$).

Tabela 5: Média (em μm) e desvio padrão da interação dos fatores para a análise de perfil de desgaste dos espécimes expostos aos desafios erosivos em HCl gasoso.

	C	CO	Nd
SA	1,4±0,16 ab	1,5±0,21 ab	1,3±0,08 a
AF	1,4±0,15 ab	1,4±0,33 ab	1,8±0,51 b
AVF	1,6±0,34 ab	1,6±0,30 ab	1,4±0,34 ab

mesma letra indica similaridade estatística - $p>0,05$

Referente ao degraú verificou-se que não houve diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos ($p>0,05$). Entretanto, para o fator associação nota-se que associação dos tratamentos ao F e VF proporcionou menor degraú e estatisticamente significativa ($p<0,05$) em relação ao SA (Figura 22). Na interação dos fatores não foi observada diferença estatisticamente significativa ($p>0,05$) entre eles (Tabela 6).

Figura 22: Degraú formado nos espécimes expostos ao HCl gasoso de acordo com os tratamentos realizados e a associação dos fatores (mesma letra indica similaridade estatística - $p>0,05$).

Tabela 6: Média (em μm) e desvio padrão da interação dos fatores para a análise de degraú dos espécimes expostos aos desafios erosivos em HCl gasoso.

	C	CO	Nd
SA	10,8±4,1 a	12,5±5,2 a	12,2±4,0 a
AF	4,90±3,1 a	6,10±5,6 a	9,10±5,1 a
AVF	10,6±3,8 a	8,70±4,0 a	7,60±3,4 a

mesma letra indica similaridade estatística - $p>0,05$

Para a rugosidade superficial verificou-se que não houve diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos ($p>0,05$). Entretanto, para o fator associação observou-se que a associação ao F e VF proporcionou menor rugosidade e estatisticamente diferente ($p<0,05$) em relação ao SA (Figura 23). Na interação dos fatores não foi observada diferença estatisticamente significativa ($p>0,05$) entre eles (Tabela 7).

Figura 23: Rugosidade de superfície dos espécimes expostos ao HCl gasoso de acordo com os tratamentos (mesma letra indica similaridade estatística - $p>0,05$).

Tabela 7: Média (em μm) e desvio padrão da interação dos fatores para a análise de rugosidade de superfície dos espécimes expostos aos desafios erosivos em HCl gasoso.

	C	CO	Nd
SA	0,44±0,05 a	0,40±0,03 a	0,40±0,02 a
AF	0,34±0,06 a	0,33±0,08 a	0,38±0,07 a
AVF	0,36±0,05 a	0,38±0,03 a	0,36±0,08 a

mesma letra indica similaridade estatística - $p>0,05$

Para a perda de volume, observou-se que não houve diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos ($p > 0,05$). Entretanto, para o fator associação verificou-se que a associação ao F e VF proporcionou menor perda de volume e estatisticamente diferente ($p < 0,05$) em relação ao SA (Figura 24). Na interação dos fatores não foi observada diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) entre eles (Tabela 8). A Figura 25 mostra imagem referente à superfície de esmalte erodida pelo HCl gasoso.

Figura 24: Perda de volume dos espécimes expostos ao HCl gasoso de acordo com os tratamentos realizados e a associação dos fatores (mesma letra indica similaridade estatística - $p > 0,05$).

Tabela 8: Média (em μm^3) e desvio padrão da interação dos fatores para a análise de perda de volume dos espécimes expostos aos desafios erosivos em HCl gasoso.

	C	CO	Nd
SA	9,70 $\pm$ 3,9 a	12,1 $\pm$ 5,8 a	11,3 $\pm$ 4,5 a
AF	4,80 $\pm$ 3,0 a	5,90 $\pm$ 5,3 a	7,30 $\pm$ 3,3 a
AVF	9,80 $\pm$ 3,8 a	8,00 $\pm$ 4,0 a	7,30 $\pm$ 2,8 a

mesma letra indica similaridade estatística - $p>0,05$

Figura 25: Imagem tridimensional da superfície de esmalte dental após desafios erosivos em HCl gasoso, demonstrando a perda de substrato dental.

Espectrometria Dispersiva de Raio X

A Tabela 9 descreve os valores em porcentagem do íon fluoreto e a proporção Ca/P da área tratada em relação à área referência. Observou-se que os fatores CO, CO/AF e Nd não apresentaram alteração do conteúdo de flúor, entretanto, nos demais fatores ocorreu uma notável diminuição na quantidade de íons flúor em relação a área de referência. Após a análise da proporção de Ca/P observou-se que não houve alteração desta proporção.

Tabela 9: Média (%) dos íons fluoreto e proporção dos íons cálcio e fósforo (Ca/P) (%) em relação a área referência.

	% F ⁻	% Ca/P
C/AF	70,45±2,47	97,97±1,20
C/AVF	83,59±0,01	99,14±0,24
CO	93,67±3,11	100,73±0,19
CO/AF	96,74±15,49	97,76±0,48
CO/AVF	76,21±0,52	100,40±2,15
Nd	95,04±0,88	99,70±2,22
Nd/AF	79,88±12,38	97,39±4,88
Nd/AVF	86,57±30,70	104,00±5,78

Difratometria Dispersiva de Raio X

A Tabela 10 demonstra as médias (%) e o desvio padrão, referentes à presença de íons fluoretos (F^-) e fluoreto de cálcio (CaF_2) no esmalte dental de acordo com os tratamentos realizados. Pode-se observar que não houve alteração no conteúdo dos mesmos após os tratamentos, exceto por ligeiro aumento observado no subgrupo C/AVF, em relação a quantidade de íons F^- , o que refletiu no CaF_2 .

Tabela 10: Média (%) e o desvio padrão referentes à presença de íons fluoretos e fluoreto de cálcio no esmalte dental.

	F^-	CaF_2
	Média (%)	Média (%)
C	11,66±3,60	2,80±0,87
C/AF	11,66±3,20	2,83±0,75
C/AVF	13,90±2,90	3,36±0,66
CO	10,33±2,48	2,46±0,63
CO/AF	10,00±2,77	2,40±0,70
CO/AVF	11,43±2,85	2,73±0,65
Nd	10,96±2,88	2,60±0,69
Nd/AF	10,53±2,31	2,53±0,57
Nd/AVF	10,70±2,19	2,60±0,52

Microscopia Eletrônica de Varredura

As Figuras 26 e 27 são imagens da superfície de esmalte em MEV, observa-se que há presença de trincas na superfície do esmalte na maioria dos tratamentos superficiais, exceto pelos C, CO/AVF, Nd/AF e Nd/AVF. Entretanto, não observou-se áreas com alterações morfológicas, como a ablação ou o derretimento e a fusão do esmalte.

Figura 26: Superfície de esmalte após diferentes tratamentos, observa-se a presença de trincas em todos os espécimes.

Figura 27: Superfície de esmalte após diferentes tratamentos, observa-se a presença de trincas nos fatores CO/AF e Nd.

4.2. Resultados Estudo *in situ*

No estudo *in situ*, após 30 dias de exposição em meio bucal, não observou-se alteração na superfície de esmalte exposto ao meio bucal dos voluntários, exceto pelos tratamentos realizados com o laser CO₂ (Figura 28), desta forma, o valor numérico da maioria das análises foi igual a zero (0). Os tratamentos CO e CO/AF apresentaram inúmeras trincas na superfície do esmalte, as quais geraram áreas pontuais de erosão (Figura 29) nos grupos Suspeita e DRGE (Tabela 11), entretanto, não foi possível detectar diferenças estatísticas entre os diferentes tratamentos ($p>0,05$).

Tabela 11: Médias (μm e μm^3) referentes às análises de perfil de desgaste, degrau, rugosidade superficial e perda de volume.

Grupos	Análises	C	C/AF	CO	CO/AF	Nd	Nd/AF
Pacientes Saudáveis	Perfil (μm)	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
	Degrau (μm)	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
	Rugosidade (μm)	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
	Volume (μm^3)	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
Pacientes Suspeitos	Perfil (μm)	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0,7 $\pm$ 1,5	0,3 $\pm$ 0,9	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
	Degrau (μm)	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	13,6 $\pm$ 28,9	6,9 $\pm$ 25,0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
	Rugosidade (μm)	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0,3 $\pm$ 0,7	0,2 $\pm$ 0,5	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
	Volume (μm^3)	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	7,5 $\pm$ 16,0	2,7 $\pm$ 10,0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
Pacientes c/ DRGE	Perfil (μm)	0,0 $\pm$ 0,2	0 $\pm$ 0	0,8 $\pm$ 1,3	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
	Degrau (μm)	0,1 $\pm$ 0,3	0 $\pm$ 0	12,2 $\pm$ 20,4	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
	Rugosidade (μm)	0,0 $\pm$ 0,1	0 $\pm$ 0	0,4 $\pm$ 0,6	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
	Volume (μm^3)	0,0 $\pm$ 0,1	0 $\pm$ 0	6,3 $\pm$ 10,6	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0

Figura 28: Imagens A e B referentes à superfície de esmalte, ilustrando a área referência e a área exposta por 30 dias em meio bucal.

Figura 29: Esmalte dental irradiado com laser CO₂, ilustrando as trincas na superfície e as áreas com lesões erosivas. Área ampliada ilustrando a lesão erosiva.

Discussão

5. *Discussão*

Estudo in vitro

O refluxo gastroesofágico é o movimento involuntário do conteúdo gástrico do estômago para o esôfago e cavidade bucal (Lemme, 2003). Um grande número de indivíduos portadores da DRGE apresentam sinais clínicos de erosão dental, sendo esta atribuída à constante exposição dos elementos dentais ao ácido clorídrico oriundo do estômago.

Estudos *in vivo* relatam alta incidência de erosão dental em pacientes com DRGE (Wang et al., 2010; Farahmand et al., 2013). Em alguns casos a DRGE é assintomática (Woodland et al., 2010), desta forma, quando há sinais clínicos de erosão dental, com lesões localizadas na face palatina e oclusal dos dentes superiores deve-se suspeitar da doença e diagnosticá-la (Lussi et al., 2011).

O alto índice de ocorrência da DRGE e o alto grau de comprometimento do elemento dental têm aumentado o interesse nesta área. Muitos estudos foram realizados com o objetivo de quantificar e prevenir a erosão causada pela ação do ácido clorídrico na forma líquida e demonstraram que o mesmo possui grande potencial erosivo, sendo sua ação sobre o esmalte e a dentina superior à ação dos refrigerantes (Bartlett et al., 2001; Esteves-Oliveira et al., 2012; Wegehaupt et al., 2012).

O refluxo líquido e gasoso é comum em pacientes com DRGE, a presença do gás nos episódios de refluxo há tempos tem sido relatada (Sifrim et al., 1999; Tutuian et al., 2008; Woodland et al., 2010; Sifrim; Zerbib, 2012). Recente estudo realizado em pacientes diagnosticados com a doença e sob tratamento com terapias ácido-supressoras, demonstrou por meio da impedânciometria que 49,4% dos episódios de refluxo são compostos apenas por líquido e 50,6% são compostos pela mistura líquido/gás (Tutuian et al., 2008). Outro estudo comparou os episódios de refluxo em indivíduos saudáveis e portadores da DRGE e demonstrou que em indivíduos

saudáveis a presença do gás, isolado ou a mistura, durante os episódios de refluxo é maior (68%) em relação aos doentes (51%), sendo que durante os episódios de refluxo o líquido precede o gás em 77% dos casos (Sifrim et al., 2001).

Pode-se verificar que o gás está presente em mais da metade dos episódios de refluxo, atuando juntamente com o líquido, entretanto a ação do mesmo na erosão do esmalte dental é desconhecida. Desta forma, o estudo de sua ação é de grande relevância, pois pode iniciar ou acentuar o processo erosivo.

Para a realização dos desafios erosivos em HCl gasoso foi desenvolvida uma nova metodologia, este fato, dificultou a discussão dos resultados do presente estudo por não haver na literatura dados relacionados ao gás.

A erosão dental ocorre por meio da dissolução dos cristais de esmalte por substâncias ácidas, as quais sofrem dissociação quando em contato com a água, liberando íons hidrogênio que se ligam ao carbonato ou ao fosfato, removendo-os da superfície dental (Featherstone, 2000a). Inicialmente, há o amolecimento da superfície do esmalte e, em seguida, a perda de substrato.

A espessura da camada afetada pelo ácido é de 0,2 a 0,3 μm , sendo assim, a contínua exposição ao meio ácido gera um processo de amolecimento da superfície de camada a camada, ocasionando a perda permanente de substrato até a exposição e comprometimento da dentina. A desmineralização do esmalte inicia-se com a perda de mineral e aumento da rugosidade superficial (Nekrashevych; Stosser, 2003), a contínua desmineralização leva à diminuição da dureza, à erosão e a vulnerabilidade física (Voronets et al., 2008). O processo erosivo é dependente do tempo de imersão e da característica do ácido a que foi exposto (Wiegand et al., 2007; Voronets; Lussi, 2010).

Métodos para detecção do início e da progressão da erosão dental são escassos, a manifestação clínica é o principal método diagnóstico destas lesões (Lussi et al., 2006). Os sinais típicos da erosão é o surgimento de áreas lisas e brilhantes, com o esmalte da margem gengival intacto (Lussi et al., 2011). A incidência destas lesões na população tem aumentado nos últimos anos, este fato é atribuído às mudanças no estilo de vida da população, a qual ingere quantidades excessivas de

bebidas e alimentos ácidos (Packer, 2009) e, também, à alta prevalência da doença do refluxo gastroesofágico entre a população (Lemme, 2003).

Há a constante busca por métodos preventivos eficientes contra a erosão, estudos relatam que o uso diário de substâncias fluoretadas aumenta a resistência ácida do esmalte e da dentina (Jensen et al., 1987; Ganss et al., 2001). O íon flúor se deposita na superfície do esmalte na forma de fluoreto de cálcio atuando como um reservatório, sendo considerado estável em pH neutro. Porém, com a queda do pH do meio, o íon flúor é liberado atuando no processo de remineralização (ten Cate et al., 1997; Featherstone, 2000b). Entretanto, é necessário seu uso frequente (Cury, 2002), uma vez que, após 48h em saliva artificial a concentração de fluoreto de cálcio reduz cerca de 10 vezes (Tenuta et al., 2008).

Muitos estudos associando o laser aos fluoretos tem demonstrado haver interação de sinergismo entre ambos (Tagomori; Morioka, 1989; Hossain et al., 2002). Acredita-se que a irradiação laser promove maior retenção e incorporação de flúor pelo substrato dental, que estabelece ligações mais efetivas do flúor com o esmalte, (Tepper et al., 2004; Castellan et al., 2007; Liu et al., 2013) e que promove a formação de apatita fluoretada (Ying et al., 2004).

Estudo recente observou que o uso isolado do laser CO₂ e a aplicação do fluoreto, seguida pela irradiação laser aumentou a microdureza do esmalte quando comparado ao flúor isolado ou à irradiação laser seguida pela aplicação do fluoreto (Esteves-Oliveira et al., 2011). Entretanto, outros estudos relataram não haver sinergismo entre o flúor e o laser, sendo a ação desta associação semelhante à ação do fluoreto aplicado isoladamente (Magalhães et al., 2008; Steiner-Oliveira et al., 2010; Magalhães et al., 2011; Derceli et al., 2013). Devido a estas contradições da literatura, o presente estudo avaliou o tratamento superficial com laser de CO₂ e ND:YAG, associado e não associado aos fluoretos em duas formas de apresentação, gel e verniz.

Com o intuito de diminuir o surgimento e/ou a progressão das lesões erosivas causadas pelo HCl líquido e gasoso, foram utilizados diferentes tipos de tratamentos preventivos sobre o esmalte dental. Os lasers Nd:YAG e CO₂ foram selecionados por haver relatos na literatura sobre sua superioridade no aumento da resistência ácida

do esmalte em relação aos outros lasers (Bedini et al., 2010; Corrêa-Afonso et al., 2012; Corrêa-Afonso et al., 2013; Cohen et al., 2014).

Os lasers foram irradiados sobre o gel e o verniz fluoretado, pois em estudo realizado com o laser Er:YAG associado ao gel fluoretado de diferentes maneiras, foi observado que a aplicação simultânea do laser ao gel fluoretado e a aplicação apenas do gel fluoretado foram mais eficientes no aumento da resistência ácida quando comparados às outras formas de associação (Derceli et al., 2013). Entretanto, neste estudo não foi observado aumento na resistência ácida após a irradiação com os lasers Nd:YAG e CO₂ (Magalhães et al., 2011). Também não foi observado sinergismo entre os lasers e os fluoretos, ou seja, não houve a potencialização dos efeitos dos tratamentos após a associação dos mesmos.

Observou-se que os tratamentos preventivos apresentaram comportamentos distintos de acordo com o tipo de agente erosivo. Na erosão em HCl líquido observou-se que o uso do verniz fluoretado proporcionou uma superfície mais susceptível à erosão do esmalte, por sua vez, o gel fluoretado promoveu uma superfície mais resistente ao desafio erosivo. Contudo, para os desafios realizados em HCl gasoso, observou-se que tanto o uso do verniz fluoretado quanto do gel fluoretado, propiciaram maior resistência ácida do esmalte, reduzindo a erosão. Entretanto, quando se empregou o laser Nd:YAG associado ao gel fluoretado proporcionou maior susceptibilidade à erosão.

Na espectrometria dispersiva de raio X (EDS), observou-se que todos os grupos/subgrupos apresentaram diminuição na quantidade de flúor em relação à área referência do espécime, sendo que, os grupos associados aos fluoretos (CO/AVF, Nd/AF e Nd/AVF) apresentaram maior decréscimo. Este fato pode estar relacionado aos procedimentos a que os espécimes foram submetidos, para a análise em MEV/EDS, os mesmos passaram por processos de desidratação em álcool e limpeza com EDTA, o que pode ter removido o fluoreto de cálcio (CaF₂) superficial, uma vez que sua presença na superfície do esmalte é muito sensível.

O fluoreto de cálcio é formado pela exposição do esmalte às substâncias fluoretadas, os íons fluoretos ali presentes se ligam ao cálcio da superfície formando o CaF₂, o qual está presente na cavidade bucal de maneira dinâmica, sendo

facilmente perdido em meio bucal por troca, difusão e migração para a saliva (Featherstone, 2000b), levando a uma redução do seu conteúdo em um curto período de tempo. Sendo assim, os processos aos quais os espécimes foram submetidos podem ter removido o fluoreto superficial

A análise de difratometria de raio X (DRX), não demonstrou diferença entre os grupos, ou seja, nenhum tratamento foi capaz de aumentar o conteúdo de flúor e de fluoreto de cálcio na superfície de esmalte. Este fato também pode ser atribuído à forma de preparo dos espécimes, os quais foram submetidos à limpeza em água deionizada e ultrassom, o que, possivelmente, removeu os íons fluoretos da superfície. Estudo realizado para quantificar a retenção de fluoretos na superfície do esmalte, concluiu que após a associação do laser aos fluoretos houve aumento da retenção em relação à não associação, entretanto neste estudo a realização da quantificação de fluoretos foi realizada de outra maneira, provavelmente não interferindo no conteúdo de fluoreto superficial (Esteves-Oliveira et al., 2011).

De modo geral, a associação dos lasers aos fluoretos não demonstraram sinergismo entre ambos, uma das hipóteses para estes resultados foi o modo de irradiação dos lasers, os quais foram irradiados sobre o gel e o verniz fluoretado, o que possivelmente, interferiu na ação dos mesmos na superfície do esmalte (Rauci-Neto, 2013). Outra hipótese pode estar associada o fato de que os tratamentos foram realizados apenas uma vez, simulando o procedimento clínico com uma única aplicação profissional, desta forma, os tratamentos podem ter sido insuficientes diante dos extremos desafios erosivos realizados. Estudo realizado recentemente, demonstrou que repetidas aplicações do laser CO₂ aumentou a resistência ácida do esmalte quando comparado a uma aplicação (Vieira et al., 2013)

A ação dos fluoretos e do laser ocorre na superfície do esmalte, sendo assim, supõem-se que os excessivos desafios erosivos removeram toda a superfície tratada e com a continuidade dos desafios, as superfícies de esmalte foram erodidas na mesma intensidade, eliminando a ação preventiva dos tratamentos. Estudos demonstraram que a espessura de esmalte dental alterada pela irradiação laser é inferior à 12 µm (Fried et al., 1997; Zuerlein et al., 1999), desta forma, de acordo com os dados referentes ao degrau, toda a superfície tratada pelos lasers foi removida pelo processo erosivo.

A aplicação dos fluoretos também foi insuficiente diante dos extremos desafios ácidos, já que os íons fluoretos se estabelecem na superfície do esmalte por meio de fracas ligações com os íons cálcio, sendo os mesmos facilmente perdido em meio bucal (Featherstone, 2000b; Tenuta et al., 2008). Esta hipótese é sustentada pelo que pode-se observar nas análises de DRX e EDS, onde o processo de desidratação e/ou limpeza superficial, provavelmente, foi suficiente para remover o depósito de fluoreto de cálcio da superfície. Assim, torna-se necessário a realização de estudos com desafios erosivos menos agressivos (menos desafios diários e por menos tempo de exposição) ou a realização de maior número de tratamentos superficiais antes ou entre os desafios erosivos.

Observando o conteúdo de cálcio (Ca) e fósforo(P) na análise de EDS, todos os grupos/subgrupos não apresentaram variação na relação Ca/P, desta forma, os tratamentos com os lasers não surtiram efeito. A proporção Ca/P define a fase do fosfato de cálcio da hidroxiapatita, sendo importante para avaliar a distribuição de cálcio e fósforo na estrutura e tem relação com a solubilidade deste material frente a desafios ácidos, sendo que, quanto menor a relação Ca/P maior a solubilidade do tecido.

Analisando as imagens obtidas na microscopia eletrônica de varredura (MEV), observa-se a presença de trincas, este fato pode estar relacionado à técnica de preparação dos espécimes, os quais são submetidos à desidratação e expostos ao vácuo. Pelo fato do esmalte dental ser friável e a pressão na câmara de vácuo ser alta, ocorre facilmente a formação de trincas na superfície. Nenhum dos tratamentos realizados com os lasers Nd:YAG e CO₂ promoveram alterações morfológicas na superfície de esmalte, como áreas ablacionadas ou sugestivas de fusão e recristalização (Corrêa-Afonso et al., 2012; Raucci-Neto, 2013).

A literatura expõe dados controversos sobre os tratamentos preventivos contra a erosão. Possivelmente, estes dados não se correlacionam devido às diferenças de parâmetros utilizados nos estudos. Ainda não há o parâmetro ideal estabelecido e a busca por novas alternativas de tratamentos leva a uma grande variação das metodologias e, conseqüentemente, dos resultados. Entretanto, o íon flúor ainda é um método eficaz e econômico para ser utilizado na prevenção da erosão dental.

Observa-se que tanto o ácido clorídrico na forma líquida quanto na forma gasosa possui efeito erosivo sobre o esmalte, entretanto apresentam comportamentos distintos, sendo necessário mais estudos envolvendo o HCl gasoso para compreender melhor sua forma de atuação e a partir daí desenvolver métodos preventivos efetivos.

Os resultados referentes aos desafios erosivos em HCl gasoso foram muito importantes, uma vez que, diante do seu potencial erosivo, o mesmo pode atuar juntamente com o HCl líquido durante os episódios de refluxo, potencializando sua ação erosiva. Entretanto, a discussão dos resultados referentes ao gás é dificultada por não haver na literatura estudos que avaliem a ação do gás na superfície dental.

Estudo in situ

Estudos *in situ* são, na maioria das vezes, realizados por meio do uso de dispositivos intrabucais contendo espécimes dentais, os quais ficam expostos ao meio bucal durante a sua utilização pelos voluntários da pesquisa, sendo os desafios erosivos realizados fora da cavidade bucal (Hall et al., 1999; Jaeggi; Lussi, 1999; Tenuta et al., 2008; Corrêa-Afonso et al., 2013a). No presente estudo objetivou-se avaliar o processo erosivo que ocorre no ambiente bucal de pacientes portadores da DRGE, sendo necessária a exposição contínua dos espécimes de esmalte ao meio bucal. Para evitar a não utilização correta e contínua dos dispositivos intrabucais, os espécimes foram cimentados na face palatina de molares e pré-molares (Faraoni-Romano et al., 2009), evitando assim, possíveis interferências e resultado falso negativo.

No estudo *in vitro*, tanto os espécimes expostos ao HCl líquido, quanto os expostos ao HCl gasoso apresentaram áreas de desgaste em esmalte. Em relação ao estudo *in situ*, os espécimes de esmalte ficaram expostos na cavidade bucal dos voluntários por 30 dias e após este período não se observou alterações na superfície, sendo que todos os voluntários selecionados possuíam lesões erosivas de esmalte semelhantes às descritas na literatura (Gandara et al., 1999), exceto o grupo controle.

Outro fator importante foi que o laser de CO₂ não causou trincas no esmalte dos espécimes avaliados no estudo *in vitro*, entretanto, quando expostos aos

intemperes do meio bucal houve a formação de várias trincas na superfície do esmalte que favoreceram a formação de áreas erodidas, sendo este outro fator que aponta as divergências entre o estudo *in vitro* e *in situ*. Estes resultados corroboram com o estudo que comparou o efeito protetor da saliva contra a erosão dental em estudos *in situ* e *in vitro* e demonstrou que a saliva apresentou maior proteção no estudo *in situ* (Hall et al., 1999).

As trincas formadas na superfície do esmalte, podem ser atribuídas à perda de carbonato e de água, que resultam na contração do esmalte (Apel et al., 2005). Recentes estudos realizados com o laser CO₂ relataram a diminuição do carbonato e da água no esmalte dental (Correa-Afonso et al., 2012b).

Estes dados são de grande relevância e mostram que os estudos *in vitro* não condizem com o que realmente ocorre na cavidade bucal (Hall et al., 1999). A erosão dental é multifatorial, onde há a necessidade da interação de vários fatores para o seu surgimento e desenvolvimento (Hall et al., 1999; Lussi; Schaffner, 2000; Tenuta et al., 2008; Voronets; Lussi, 2011; Grippo et al., 2012). Quando os desafios erosivos são realizados em laboratório, exclui-se importantes fatores que podem interferir no processo erosivo, tais como a composição e a quantidade de saliva, a frequência e tempo de exposição ao ácido, o tipo do ácido, o uso de medicamentos, o acesso a água fluoretada e a dentifrícios fluoretados.

Estudos relatam que para haver lesões com perda de substrato dental deve haver a associação de fatores como abfração, abrasão e erosão, sendo difícil diferenciá-las, pois frequentemente ocorrem simultaneamente (Nunn et al., 1996), ou seja, a força oclusal gera microtrincas no esmalte que propiciam a penetração das substâncias ácidas e o início do processo erosivo (McCoy et al., 1982; Noma et al., 2007), sendo a perda do substrato dental amolecido acentuada pela ação da escovação dental (abrasão) (Voronets; Lussi, 2010).

O contato entre os dentes ocorre durante as funções normais, as parafunções e durante a deglutição. A tensão é gerada no contato dente-a-dente e distribuída através do esmalte até a dentina e tecido periodontal (Sakaguchi et al., 1991). Forças laterais causam a flexão do dente (Morin et al., 1988) que resultam na tensão e compressão, estas forças levam a ruptura das ligações químicas entre os cristais de

hidroxiapatita do esmalte e da dentina subjacente. Estas áreas fragilizadas sob a ação da abrasão ou de substâncias ácidas leva ao surgimento de lesões não cariosas como a erosão (McCoy et al., 1982; Grippo, 1991).

O envolvimento de substâncias erosivas com o estresse por cargas estáticas é definido como corrosão por estresse (Grippo et al., 1995). Esta hipótese pode ser a explicação dos resultados do estudo *in situ*, uma vez que, os espécimes tratados pelo laser CO₂ sofreram alguma alteração superficial (estresse), o que propiciou o surgimento de trincas e partir delas ocorreu o processo erosivo. Já, os outros tratamentos superficiais realizados não causaram nenhuma alteração superficial (estresse), nem trincas. Atentando-se para o fato de que os espécimes foram cimentados de forma a não receber as forças oclusais, ficando estes livres do estresse mastigatório, não gerando trincas de esmalte, nem o surgimento de áreas erodidas.

Alguns estudos corroboram com a presente hipótese, pois observaram uma relação entre o estresse de forças oclusais e o baixo pH, sendo observado que esta associação resulta no aumento da perda de substrato pelo dente (Grippo et al., 1991ab; Mishra et al., 2006, Staninec et al., 2005; Grippo et al., 2012). As lesões não cariosas são de caráter multifatorial, onde associa-se o estresse mastigatório (abfração), a fricção (abrasão e atrição) e a erosão endógena e exógena, sendo incorreto atribuí-las a um único agente causador (Grippo et al., 2012).

A região cervical torna-se mais frágil por possuir menor conteúdo mineral em relação às áreas onde há maior espessura de esmalte (Theus et al., 1986), sendo assim, a maior concentração de tensão mastigatória nesta região propicia o início das lesões não cariosas a partir das mesmas (Rees et al., 2003; Rees et al., 2004; Noma et al., 2007), ressaltando as lesões erosivas (Mishra et al., 2006ab).

O fator abrasão demonstrou ser o menos influente no processo de perda de substrato, uma vez que, no presente estudo houve a associação do processo erosivo à abrasão e não se observou nenhum efeito. Estes dados corroboram com outros estudos, os quais relatam que a etiologia das lesões não cariosas é a associação entre cargas oclusais e bebidas ácidas, sendo que a escova dental/dentífrico não foi um fator etiológico (Faye et al., 2006).

Diante de todas estas informações, deve-se levar em consideração as diferenças no padrão de desmineralização quando analisamos estudos *in vitro*, uma vez que, são realizados de maneira extrema e não condizem com o que ocorre na cavidade bucal, sendo de extrema necessidade a realização de estudos *in situ* e *in vivo* para se conhecer o processo erosivo.

Conclusões

6. Conclusões

Com base nos resultados do presente estudo pode-se concluir que:

No estudo *in vitro* o ácido clorídrico, na forma líquida e gasosa, promoveu erosão dental, contudo apresentaram comportamentos distintos. Da mesma forma, os tratamentos preventivos realizados em ambas as formas do ácido proporcionaram efeitos diferentes. Para o HCl líquido, o uso do gel fluoretado e a irradiação com laser CO₂ promoveram menor desgaste e rugosidade, por outro lado, o processo erosivo foi mais agressivo quando do emprego do verniz fluoretado. Para o HCl gasoso verificou-se que a superfície de esmalte apresentou maior resistência ao ácido quando foram utilizados fluoretos (gel e verniz). Assim, pode-se verificar que em ambas as formas do ácido clorídrico o emprego do gel fluoretado foi mais efetivo na prevenção da erosão em esmalte.

De acordo com as análises de DRX e EDS, nenhum tratamento promoveu acréscimo de fluoretos na superfície e não promoveu alteração da relação Ca/P. Na análise morfológica, os tratamentos superficiais não causaram alterações significativas na superfície do esmalte.

No estudo *in situ*, conclui-se que a ação erosiva do HCl na cavidade bucal é diferente do ocorrido nos desafios erosivos em estudos *in vitro*. A exposição do esmalte à cavidade bucal pelo período de 30 dias foi insuficiente para causar erosão em pacientes com DRGE. O laser CO₂ promoveu trincas no esmalte exposto ao meio bucal.

*Referências
Bibliográficas*

7. Referências Bibliográficas

Akin M, Ozyilmaz OY, Yavuz T, Aykent F, Basciftci FA. Effect of Nd:YAG laser bleaching and antioxidizing agents on the shear bond strength of brackets. *Photomed Laser Surg*. 2013 Aug;31(8):365-70.

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

Amaechi BT, Higham SM, Edgar WM. Techniques for production of dental eroded lesions in vitro. *J Oral Rehabil*. 1999;26:97-102.

Ana PA, Bachmann L, Zezell DM. Lasers effects on enamel for caries prevention. *Laser Physics*. 2006;16(5):865-75.

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

Arnold WH, Dorow A, Langenhorst S, Gintner Z, Bánóczy J, Gaengler P. Effect of fluoride toothpastes on enamel demineralization. *BMC Oral Health*. 2006 Jun;6:1-6.

Azevedo DT, Faraoni-Romano JJ, Derceli JR, Palma-Dibb RG. Effect of Nd:YAG laser combined with fluoride on the prevention of primary tooth enamel demineralization. *Braz Dent J*. 2012;23(2):104-9.

Barham CP, Gotley DC, Mills A, Alderson D. Pressure events surrounding oesophageal acid reflux episodes and acid clearance in ambulant healthy volunteers. *Gut*. 1993 Apr;34(4):444-9.

Bartlett DW, Coward PY. Comparison of the erosive potential of gastric juice and a carbonated drink *in vitro*. *J Oral Rehabil*. 2001 Nov;28(11):1045-7.

Bedini R, Manzon L, Fratto G, Pecci R. Microhardness and morphological changes induced by Nd:Yag laser on dental enamel: an *in vitro* study. *Ann Ist Super Sanita*. 2010;46(2):168-72.

Benages A, Muñoz JV, Sanchiz V, Mora V, Minguez M. Dental erosion as extraesophageal manifestation of gastro-esophageal reflux. *Gut* 2006;55(7):1050-1.

Bredenoord AJ, Weusten BL, Smout AJ. Symptom association analysis in ambulatory gastro-oesophageal reflux monitoring. *Gut*. 2005;54(12):1810-7.

Castellan CS, Luiz AC, Bezinelli LM et al. *In vitro* evaluation of enamel demineralization after Er:YAG and Nd:YAG laser irradiation on primary teeth. *Photomed Laser Surg.* 2007 Abr;25(2):85-90.

Cebrián-Carretero JL, López-Arcas-Calleja JM. Gastroesophageal reflux diagnosed by occlusal splint tintion. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2006 Jan;11(1):26-8.

Chinzon D. Manifestações Extra-esofágicas e atípicas da DRGE. *Conduas Terapêuticas em Gastro* 2004;(03):31-4.

Clarke AT, Wirz AA, Manning JJ, Ballantyne SA, Alcorn DJ, McColl KE. Severe reflux disease is associated with an enlarged unbuffered proximal gastric acid pocket. *Gut.* 2008 Mar;57(3):292–7.

Cohen J, Featherstone JDB, Le CQ, Steinberg, Feuerstein O. Effects of CO₂ Laser Irradiation on Tooth Enamel Coated With Biofilm. *Lasers Surg Med.* 2014 Jan;1-8. [Epub ahead of print].

Coleman GC, Nelson JF. *Princípios de diagnóstico bucal.* Rio de Janeiro:Editora Guanabara Koogan; 1996.329p.

Corrêa-Afonso AM, Bachman L, Almeida CG, Corona SAM, Borsatto MC. FTIR and SEM analysis of CO₂ laser irradiated human enamel. 2012 Set;57(9):1153-8.

Corrêa-Afonso AM, Bachman L, Palma-Dibb. Loss of structural water and carbonate of Nd:YAG laser-irradiated human enamel. *Lasers Med Sci.* 2014 Fev [Epub ahead of print]

Corrêa-Afonso AM, Pécora JD, Palma-Dibb RG. Influence of laser irradiation on pits and fissures: an *in situ* study. *Photomed Laser Surg.* 2013 Fev;31(2):82–9.

Cury JA. Uso do flúor e controle da como doença. In: Baratieri LN et al. *Odontologia Restauradora – Fundamentos e Possibilidades.* 4a ed. São Paulo: Artes Médicas; 2002. 739 p.

Dent J, Holloway RH, Toouli J, Dodds WJ. Mechanisms of lower oesophageal sphincter incompetence in patients with symptomatic gastroesophageal reflux. *Gut.* 1988 Aug;29(8):1020–8.

Derceli JR, Faraoni-Romano JJ, Azevedo DT, Wang L, Bataglioni C, Palma-Dibb. Effect of pretreatment with an Er:YAG laser and fluoride on the prevention of dental enamel erosion. *Lasers Med Sci.* 2013 Out;23:1-6.

Eccles JD. Dental erosion of nonindustrial origin. A clinical survey and classification. *J Prosth Dent.* 1979 Dez;42(6):649-53.

El-Seraq HB. Time trends of gastroesophageal reflux disease: A systematic review. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2007 Jan;5(1):17-26.

Emerenziani S, Sifrim D, Habib FI, Ribolsi M, Guarino MPL, Rizzi M, Caviglia R, Petitti T, Cicala M. Presence of gas in the refluxate enhances reflux perception in non-erosive patients with physiological acid exposure of the oesophagus. *Gut*. 2008 Apr;57(4):443–7.

Esteves-Oliveira M, Pasaporti C, Heussen N, Eduardo CP, Lampert F, Apel C. Rehardening of acid-softened enamel and prevention of enamel softening through CO₂ laser irradiation. *J Dent*. 2011 Jun;39(6):414-21.

Esteves-Oliveira M, Yu H, de Paula Eduardo C, Meister J, Lampert F, Attin T, Wiegand A. Screening of CO₂ laser (10.6 µm) parameters for prevention of enamel erosion. *Photomed Laser Surg*. 2012 Jun;30(6):331-8.

Esteves-Oliveira M, Zezell DM, Meister J, Franzen R, Stanzel S, Lampert F, Eduardo CP, Apel C. CO₂ laser (10,6 microm) parameters for caries prevention in dental enamel. *Caries Res*. 2009;43(4):261-8.

Farahmand F, Sabbaghian M, Ghodousi S, Seddighoraee N, Abbasi M. Gastroesophageal reflux disease and tooth erosion: a cross-sectional observational study. *Gut Liver*. 2013 May;7(3):278-81.

Faraoni-Romano JJ, Turssi CP, Serra MC. Effect of a 10% carbamide peroxide on wear resistance of enamel and dentine: *In situ* study. *J Dent*. 2009;37:273-8.

Faye B, Kane AW, Sarr M, et al. Noncarious cervical lesions among a non-toothbrushing population with Hansen's disease (leprosy): initial finds. *Quintessence Int*. 2006 Sep;37(8):613–9

Featherstone JDB, Shields CP, Khademazad B, Oldershaw MD. Acid reactivity of carbonated-apatites with strontium and fluoride substitutions. *J Dent Res*. 1983 Oct;62:(10)49:53.

Featherstone JDB, Fried D. Fundamental interactions of lasers with dental hard tissues. *Medical Laser Application*. 2001; 16:181-94.

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

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

Featherstone JDB. The science and practice of caries prevention. *J Am Dent Assoc*. 2000a Jul;131(7):887-99.

Ferjeskov O, Kidd E. Cárie Dentária: a doença e seu tratamento clínico. 1a ed. São Paulo: Editora Santos; 2005. 390p.

Ferreira JM, Palamara J, Phakey PP, Rachinger WA, Orams HJ. Effects of continuous-wave CO₂ laser on the ultrastructure of human dental enamel. Arch Oral Biol. 1989;34(7):551-62.

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

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

Fried D, Featherstone JD, Visuri SR, Seka WD, Walsh JT. The caries inhibition potencial of Er:YAG and Er:YSGG laser radiation. Lasers Dent. 1996;2672:73-8.

Fried D, Glena RE, Featherstone JD, Seka W. Permanent and transient changes in the reflectance of CO₂ laser-irradiated dental hard tissues at $\lambda = 9.3, 9.6, 10.3$, and 10.6 microns and at fluences of 1-20 J/cm². Lasers Surg Med. 1997;20(1):22-31

Gandara BK, Truelove EL. Diagnosis and management of dental erosion. J Comtemporary Dent Pract. 1999 Nov;1(1):1-16.

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

Gao XL, Pan JS, Hsu CY. Laser-fluoride effect on root demineralization. J Dent Res. 2006 Out;85(10):919-23.

Gaynor EB. Laryngeal complications of GERD. J Clin Gastroenterol. 2000 Abr;30(3):S31-4.

Goodman BD, Kaufman HW. Effects of an argon laser on the crystalline properties and rate of dissolution in acid of tooth enamel in the presence of sodium fluoride. J Dent Res. 1977 Oct;56(10):1201-7.

Grippio JO, Masi JV. Role of Biodental Engineering Factors (BEF) in the etiology of root caries. J Esthet Dent. 1991 Mar-Abr;3(2):71-6.

Grippio JO, Simring M, Coleman TA. Abfraction, abrasion, biocorrosion, and the enigma of noncarious cervical lesions: a 20-yers perspective. J Esthet Restor Dent. 2012 Fev;24(1):10-23.

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

Hefferren JJ. Why is there and should there be more attention paid to dental erosion? *Compend Contin Educ Dent*. 2004 Set;25(9):4-8.

Higo T, Mukaisho K, Ling Z-Q, Oue K, Chen K-H, 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.

Holcomb DW, Young RA. Thermal decomposition of human tooth enamel. *Calcif Tissue Int*. 1980;31(1):189-20.

Hossain MM, Hossain M, Kimura Y, Kinoshita J-I, Yamada Y, Matsumoto K. Acquired acid resistance of enamel and dentin by CO₂ laser irradiation with sodium fluoride solution. *J Clin Laser Med Surg*. 2002 Apr;20(2):77-82.

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

Hsu CY, Jordan TH, Dederich DN, Wefel JS. Effects of low-energy CO₂ laser irradiation and the organic matrix on inhibition of enamel demineralization. *J Dent Res*. 2000 Sep;79(9):1725-30.

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

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

Jensen OE, Featherstone JD, Stege P. Chemical and physical oral findings in a case of anorexia nervosa and bulimia. *J Oral Pathol*. 1987 Sep;16(8):399-402.

Johansson AK, Lingström P, Imfeld T, Birkhed D. Influence of drinking method on tooth-surface pH in relation to dental erosion. *Eur J Oral Sci*. 2004 Dez;112(6):484-9.

Kaye MD. Postprandial gastro-oesophageal reflux in healthy people. *Gut*. 1977 Set;18(9):709-12.

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.

Kimura Y, Wilder-Smith P, Arrastia-Jitosho AMA, Liaw LHL, Matsumoto K, Berns MW. Effects of nanosecond pulsed Nd:YAG laser irradiation on dentine resistance to artificial caries-like lesions. *Lasers Surg Med*. 1987(1);20:15-21.

Kita T, Ishii K, Yoshikawa K, Yasuo K, Yamamoto K, Awazu K. In vitro study on selective removal of bovine demineralized dentin using nanosecond pulsed laser at wavelengths around 5.8 μm for realizing less invasive treatment of dental caries. *Lasers Med Sci*. 2014 Jan 7. [Epub ahead of print]

Larsen MJ, Brun C. A química da cárie dentária e o flúor – mecanismo de ação: In Thylstrup A, Fejerskov O. *Cariologia Clínica*. 1a ed. São Paulo: Livraria Editora Santos; 1995.33-68p.

LeGeros RZ. Calcium phosphates in demineralization/remineralization processes. *J Clin Dent*. 1999;10(2):65-73.

LeGeros RZ. Calcium phosphates in enamel, dentine and bone; in Myers HM. *Calcium Phosphates*. *Oral Biol Med*. 1991;15:108-29.

Lemme EMQ. Doença do refluxo gastroesofágico: uma afecção crônica. *Condutas terapêuticas em gastro* 2003;1:4-13.

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

Liu Y, Hsu CYS, Teo CMJ, Teoh SH. Potencial mechanism for the laser fluoride effect on enamel demineralization. *J Dent Res*. 2013;92(1):71-5.

Lopes AO, de Paula Eduardo C, Aranha AC. Clinical evaluation of low-power laser and a desensitizing agent on dentin hypersensitivity. *Lasers Med Sci*. 2013 Oct 4. [Epub ahead of print].

Lussi A, Hellwig E, Zero DT, Jaeggi T. Erosive tooth wear: diagnosis, risk factors and prevention. *Am J Dent*. 2006 Dez;19(6):319-25.

Lussi A, Kohler N, Zero D, Schaffner M, Megert B. A comparison of the erosive potential of different beverages in primary and permanent teeth using an *in vitro* model. *Eur J Oral Sci* 2000;108:110–114.

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.

Magalhães AC, Rios D, Machado MAAM, Silva SMB, Lizarelli RFZ, Bagnato VS, Buzalaf MA. Effect of Nd:YAG irradiation and fluoride application on dentin resistance to erosion in vitro. *Photomed Laser Surg*. 2008 Dez;26(6):559-63.

Magalhães AC, Romanelli AC, Rios D, Comar LP, Navarro RS, Grizzo LT, Aranha ACC, Buzalaf MAR. Effect of a single application of TiF4 and NaF varnishes and solutions combined with Nd:YAG laser irradiation on enamel erosion *in vitro*. Photomed Laser Surg. 2011 Ago;29(8):537-44.

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.

Maung NL, Wohland T, Hsu CY. Enamel diffusion modulated by Er:YAG laser, part I, FRAP. J Dent. 2007a Oct;35(10):787-93.

Maung NL, Wohland T, Hsu CY. Enamel diffusion modulated by Er:YAG laser (Part 2). Organic matrix. J Dent. 2007b Oct;35(10):794-9

McCoy G. On the longevity of teeth. Oral Implantol. 1983;11(2):248-67.

Meurman JH, Hemmerlé J, Voegel JC, Rauhamaa-Mäkinen R, Luomanen M. Transformation of hydroxyapatite to fluorapatite with high-energy CO₂ laser. Caries Res 1997;31(5):397-400.

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

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.

Mishra P, Palamara JEA, Tyas MJ, Burrow MF. Effects of loading and pH on the subsurface demineralization of dentin beams. Calcif Tissue Int. 2006 Oct;79(4):273-7.

Mohammadi Z, Palazzi F, Giardino L, Shalavi S. Microbial biofilms in endodontic infections: an update review. Biomed J. 2013 Mar-Apr;36(2):59-70.

Morin DL, Douglas WH, Cross M, DeLong R. Biophysical stress analysis of restored teeth: experimental strain measurement. Dent Mater. 1988 Feb;4(1):41-8.

Nammour S, Demortier G, Florio P, Delhaye Y, Pireaux JJ, Morciaux Y, Powell L. Increase of enamel fluoride retention by low fluence argon laser *in vivo*. Lasers Surg Med. 2003 Mar;33(3):260-3.

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

Noma N, Kakigawa H, Kozono Y, Yokota M. Cementum crack formation by repeated loading in vitro. J Periodontol. 2007 Abr;78(4):764–9.

Nunn J, Shaw L, Smith A. Tooth wear – dental erosion. Br Dent J. 1996 Mai;180(9):349-52.

Parker CD. Cola-induced hypocalaemia: a super-sized problem. Int j Clin Pratct. 2009 Jun;63(6):833-5.

Parker S. Surgical lasers and hard dental tissue. British Dent J. 2007 Abr;202:445 – 454.

Phan ND, Fried D, Featherstone JDB. Laser-induced transformation of carbonated apatite to fluorapatite on bovine enamel (proceedings paper). SPIE. 1999;3593:233-40.

Powell GL, Yu D, Higuchi WI, Fox JL. Comparison of three lasers on demineralization of human enamel. SPIE Proc Lasers in Orthopedic, Dental, and Veterinary Medicine II. 1993 Jul;1880:188-92.

Raucci-Neto W. Uso do laser Nd:YAG na prevenção de cárie oclusal na dentição decidua e permanente: estudo *in vivo* e *in vitro* [tese]. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2013.

Rees JS, Hammadeh M, Jagger DC. Abfraction lesion formation in maxillary incisors, canines, and premolars: a finite element study. Eur J Oral Sci. 2003 Abr;111(2): 149–54.

Rees JS, Hammadeh M. Undermining of enamel as a mechanisms of abfraction lesion formation a finite element study. Eur J Oral Sci. 2004 Ago;112(4):347–52.

Rios D, Magalhães AC, Machado MAAM, Silva SMB, Lizarelli RFZ, Bagnato VS, Buzalaf MAR. *in vitro* evaluation of enamel erosion after Nd:YAG laser irradiation and fluoride application. Photomed Laser Surg. 2009 Out;27(5):743-7.

Sakaguchi RL, Brust EW, Cross M, DeLong R, Douglas WH. Independent movement of cusps during occlusal loading. Dent Mater. 1992 Jul;7(3):186-90.

Sandler RS, Everhart JE, Donowitz M, Adams E, Cronin K, Goodman C, Gemmen E, Shah S, Avdic A, Rubin R . The burden of selected digestive diseases in the United States. Gastroenterol. 2002 Mai;122 (5):1500-11.

Schindlbeck NE, Heinrich C, König A, Dendorfer A, Pace F, Muller- Lissner SA. Optimal thresholds, sensitivity, and specificity of long-term pH-metry for the detection of gastroesophageal reflux disease. Gastroenterol. 1987 Jul;93(1):85–90.

Shaheen NJ, Hansen RA, Morgan DR, Gangarosa LM, Ringel Y, Thiny MT, Russo MW, Sandler RS. The burden of gastrointestinal and liver diseases, 2006. *Am J Gastroenterol*. 2006 Set;101(9):2128–38.

Sifrim D, Blondeau K. Technology insight: The role of impedance testing for esophageal disorders. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol*. 2006 Abr;3(4):210–9.

Sifrim D, Holloway R, Silny J, Xin Z, Tack J, Lerut A, Janssens J. Acid, nonacid, and gas reflux in patients with gastroesophageal reflux disease during ambulatory 24-hour pH-impedance recordings. *Gastroenterol*. 2001 Jun;120(7):1588–98

Sifrim D, Silny J, Holloway RH, Janssens JJ. Patterns of gas and liquid reflux during transient lower oesophageal sphincter relaxation: a study using intraluminal electrical impedance. *Gut*. 1999 Jan;44(1):47–54.

Sifrim D, Zerbib F. Diagnosis and management of patients with reflux symptoms refractory to proton pump inhibitors. *Gut*. 2012 Set;61:1340-54.

Staninec M, Nalla RK, Hilton JF, Ritchie RO, Watanabe LG, Nonomura G, Marshall GW, Marshall SJ. Dentin erosion simulation by cantilever beam fatigue and pH change. *J Dent Res*. 2005 Abr;84(4):371–5.

Steiner-Oliveira C, Nobre-dos-Santos M, Zero DT, Eckert G, Hara AT. Effect of a pulsed CO2 laser and fluoride on the prevention of enamel and dentine erosion. *Arch Oral Biol*. 2010 Fev;55(2):127-33.

Stern RH, Sognnaes RF. Laser inhibition of dental caries suggested by first tests *in vivo*. *J Am Dent Assoc*. 1972 Nov;85(5):1087-90.

Strohmenger L, Brambilla E. The use of fluoride varnishes in the prevention of dental caries: a short review. *Oral Dis*. 2001 Mar;7(2):71-80.

Tagliaferro EPS, Rodrigues LKA, Nobre dos Santos M, Soares LES, Martin AA. Combined effects of carbon dioxide laser and fluoride on demineralized primary enamel: an *in situ* study. *Caries Res*. 2007;41(1):74-6.

Tagomori S, Morioka T. Combined effects of laser and fluoride on acid resistance of human dental enamel. *Caries Res*. 1989;23(4):225-31.

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

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

Tenuta LMA, Cerezetti RV, Del Bel Cury AA, Tabchoury CPM, Cury JA. Fluoride release from CaF₂ and enamel demineralization. *J Dent Res*. 2008;87(11):1032-6.

Tepper AS, Zehnder M, Pajarola GF, Schmidlin PR. Increased fluoride uptake and acid resistance by CO₂ laser-irradiation through topically applied fluoride on human enamel *in vitro*. *J Dent*. 2004 Nov;32(8):635-41.

Toro CV, Derceli Jdos R, Faraoni-Romano JJ, Marchi P, Pécora JD, Palma-Dibb RG. The use of an Er:YAG laser to remove demineralized dentin and its influence on dentin permeability. *Microsc Res Tech*. 2013 Mar;76(3):225-30.

Tsai CL, Lin YT, Huang ST, Chang HW. In vitro acid resistance of CO₂ and Nd:YAG laser-treated human tooth enamel. *Caries Res*. 2002 Nov-Dec;36(6):423-9.

Tutuian R, Vela MF, Hill EG, Mainie I, Agrawal A, Castell DO. Characteristics of symptomatic reflux episodes on acid suppressive therapy. *Am J Gastroenterol*. 2008 May;103(5):1090-6.

Tutuian R, Vela MF, Hill EG, Mainie I, Agrawal A, Castell DO. Characteristics of symptomatic reflux episodes on acid suppressive therapy. *Am J Gastroenterol*. 2008;103:1090-6.

Valena V, Young WG. Dental erosion patterns from intrinsic acid regurgitation and vomiting. *Aust Dent J*. 2002 Jun;47(2):106-15.

van Wijk MP, Sifrim D, Rommel N, Benninga MA, Davidson GP, Omari TI. Characterization of intraluminal impedance patterns associated with gas reflux in healthy volunteers. *Neurogastroenterol Motil*. 2009 Aug;21(8):825-55.

Voronets J, Jaeji T, Buergin W, Lussi A. Controlled toothbrush abrasion of softened human enamel. *Caries Res*. 2008;42(4):286-90

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

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

Wang GR, Zhang H, Wang ZG, Jiang GS, Guo CH. Relationship between dental erosion and respiratory symptoms in patients with gastro-oesophageal reflux disease. *J Dent*. 2010 Nov;38(11):892-8.

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):416-22.

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.

Woodland P, Sifrim D. The refluxate: The impact of its magnitude, composition and distribution. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2010 Dez;24(6):861-71

Ying D, Chuah GK, Hsu CY. Effect of Er:YAG laser and organic matrix on porosity changes in human enamel. *J Dent.* 2004 Jan;32(1):127-35.

Anexo 1

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto

Comitê de Ética em Pesquisa

Of.ATAc.CEP/33511/FORP-USP/23.08.2011

CHLS/geadd

Ref. processo n.º **2010.1.543.58.8**

CAAE n.º 0032.0.138.000-10

Senhora Pesquisadora:

Informamos que o Comitê de Ética em Pesquisa, em sua 122.ª Sessão, realizada em 18 de agosto de 2011, **aprovou a solicitação de prorrogação de prazo por 24 meses para o desenvolvimento do Projeto de Pesquisa** intitulado "*Influência do refluxo gastroesofágico nas propriedades do substrato dental*".

Na oportunidade, lembramos da necessidade de entregar na Secretaria do Comitê, com os formulários preenchidos pelo pesquisador responsável, os **Relatórios Parciais** nos dias **18 de agosto de 2012 e 18 de agosto de 2013** e o **Relatório Final** no dia **18 de agosto de 2014**.

GISELE ELLENE DE ANDRADE DA DALTI

Secretária do Comitê de Ética em Pesquisa

Ilma. Sra.

PG. JULIANA DOS REIS DERCELI (Profa. Dra. Regina Guenka Palma Dibb)

Departamento de Odontologia Restauradora
desta Faculdade

Anexo 2

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(Capítulo IV, itens 1 a 3 da Resolução 196/96 – Conselho Nacional de Saúde)

Eu _____, declaro participar de livre e espontânea vontade da pesquisa intitulada **“Influência do refluxo gastroesofágico nas propriedades do substrato dental”**, conduzida pela cirurgiã-dentista Juliana dos Reis Derceli, aluna do Curso de Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade Odontologia de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, sob a orientação das Profa. Dra. Regina Guenka Palma-Dibb, Dra. Juliana Jendiroba Faraoni-Romano e Prof. Dr. César Bataglion.

As lesões não cariosas como o desgaste dos dentes são alterações comuns à boca, podem ser causadas por fatores externos como a dieta ácida e medicamentos ou internos como a bulimia (ato de causar o vômito) e a doença do refluxo (regurgitação). O suco do estômago que atinge a boca nos casos de refluxo causa a perda de mineral da superfície do dente, levando à perda de estrutura, sensibilidade do dente e comprometimento da estética. Sendo assim se torna relevante a avaliação da agressão sofrida pelo dente quando em contato com o suco do estômago.

Declaro que fui devidamente esclarecido(a), de forma oral e por escrito, que:

- O material obtido será utilizado para uma pesquisa na área odontológica, onde será avaliada o desgaste do dente causada pelo suco do estômago em pacientes portadores de refluxo (regurgitação).
- Sei que os meus dentes serão avaliados e que serão fixados neles 6 pedaços de esmalte bovino. A avaliação dos pedaços será realizada após 30 e 60 dias.
- Vou escovar meus dentes e me alimentar normalmente.
- Estes procedimentos não irão causar nenhum prejuízo a minha integridade física ou moral;
- No decorrer da pesquisa, quando necessário receberei atendimento odontológico;
- Tenho plena liberdade de recusar minha participação nesta pesquisa, assim como tenho liberdade de me retirar desta pesquisa a qualquer momento, sem nenhuma penalização ou prejuízo;
- Os pesquisadores se comprometem a prestar assistência, caso ocorra algum problema relacionado à execução da parte clínica do projeto (PG. Juliana dos Reis Derceli –

Avenida do Café, S/N - Departamento de Odontologia Restauradora, Dentística- Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – Tel: 3602-4068).

- Não é previsto o ressarcimento de despesas ou indenização, já que a conduta não prejudica a saúde física ou moral;
- Estou ciente de que esta pesquisa tem como responsáveis a Pós-graduanda Juliana dos Reis Derceli, Profa. Dra. Regina Guenka Palma-Dibb, Dra. Juliana Jendiroba Faraoni-Romano e Prof. Dr. César Bataglione.

Assino este documento de livre e espontânea vontade, estando ciente do seu conteúdo.

Ribeirão Preto, _____ de _____ de 2013.

PG. Juliana dos Reis Derceli
CPF:291300178-58

Profa. Dra. Regina Guenka Palma Dibb
CPF:145831718-89

Dra. Juliana Jendiroba Faraoni-Romano
CPF:214308568-07

Prof. César Bataglione
CPF:005748458-95

Assinatura do paciente

Anexo 3

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO**

FICHA CLÍNICA

Nome do paciente: _____

Endereço: _____

Bairro: _____ Cidade: _____

Telefones de contato: _____

Profissão: _____ Estado Civil: _____ Data Nasc: _____

Sexo: () Masculino () Feminino Idade: _____

Cirurgias Prévias: () Não () Sim. Quais?

Fumante: () Não () Sim

Ingestão de álcool: () não () sim Quantas vezes por semana? _____

Faz uso de algum medicamento? () não () sim

Qual? _____

DOENÇAS SISTÊMICAS:

() Diabetes

() Hipertensão

() Doença do refluxo Gastroesofágico

() Cardiopatias

() Anorexia/Bulimia

() Alguma doença crônica Qual? _____

SINTOMAS:

Pirose () não () sim Quantas vezes por semana: _____

Aumenta após as refeições () não () sim

Regurgitação () não () sim Quantas vezes por semana: _____

Aumenta após as refeições () não () sim

Disfagia/odinofagia () não () sim Quantas vezes por semana: _____

Aumenta após as refeições () não () sim

Dor retroesternal () não () sim Quantas vezes por semana: _____

Aumenta após as refeições () não () sim

Náusea () não () sim Quantas vezes por semana: _____

Aumenta após as refeições () não () sim

Tosse () não () sim Quantas vezes por semana: _____

Aumenta após as refeições () não () sim

Otalgias () não () sim Quantas vezes por semana:_____

Rouquidão () não () sim Quantas vezes por semana:_____

Apresenta algum outro sintoma? () não () sim Qual? _____

Ribeirão Preto,____ de _____2013

Assinatura do paciente

Anexo 4

Tabela de alimentação semanal

Nome: _____

Dias	Café da manhã	Qual?	Almoço	Qual?	Café da Tarde	Qual?	Jantar	Qual?
__/__/__	Refrigerante ☐ Suco ☐ Frutas ☐		Refrigerante ☐ Suco ☐ Frutas ☐		Refrigerante ☐ Suco ☐ Frutas ☐		Refrigerante ☐ Suco ☐ Frutas ☐	
__/__/__	Refrigerante ☐ Suco ☐ Frutas ☐		Refrigerante ☐ Suco ☐ Frutas ☐		Refrigerante ☐ Suco ☐ Frutas ☐		Refrigerante ☐ Suco ☐ Frutas ☐	
__/__/__	Refrigerante ☐ Suco ☐ Frutas ☐		Refrigerante ☐ Suco ☐ Frutas ☐		Refrigerante ☐ Suco ☐ Frutas ☐		Refrigerante ☐ Suco ☐ Frutas ☐	
__/__/__	Refrigerante ☐ Suco ☐ Frutas ☐		Refrigerante ☐ Suco ☐ Frutas ☐		Refrigerante ☐ Suco ☐ Frutas ☐		Refrigerante ☐ Suco ☐ Frutas ☐	
__/__/__	Refrigerante ☐ Suco ☐ Frutas ☐		Refrigerante ☐ Suco ☐ Frutas ☐		Refrigerante ☐ Suco ☐ Frutas ☐		Refrigerante ☐ Suco ☐ Frutas ☐	
__/__/__	Refrigerante ☐ Suco ☐ Frutas ☐		Refrigerante ☐ Suco ☐ Frutas ☐		Refrigerante ☐ Suco ☐ Frutas ☐		Refrigerante ☐ Suco ☐ Frutas ☐	
__/__/__	Refrigerante ☐ Suco ☐ Frutas ☐		Refrigerante ☐ Suco ☐ Frutas ☐		Refrigerante ☐ Suco ☐ Frutas ☐		Refrigerante ☐ Suco ☐ Frutas ☐	