GISELA MUASSAB CASTANHO

Estudo comparativo *in vitro* das estruturas inorgânicas e orgânicas
da dentina humana e bovina saudável e esclerosada:
nanodureza, concentração de Ca e P e análise morfológica

São Paulo
2010

GISELA MUASSAB CASTANHO

Estudo comparativo *in vitro* das estruturas inorgânicas e orgânicas
da dentina humana e bovina saudável e esclerosada:
nanodureza, concentração de Ca e P e análise morfológica

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

Área de Concentração: Dentística

Orientador: Prof. Dr. Antonio Alberto de
Cara

São Paulo
2010

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

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

Castanho, Gisela Muassab

Estudo comparativo *in vitro* das estruturas inorgânicas e orgânicas da dentina humana e bovina saudável e esclerosada: nanodureza, concentração de Ca e P e análise morfológica / Gisela Muassab Castanho; orientador Antonio Alberto de Cara. -- São Paulo, 2010.

101p. : fig., tab.; 30 cm.

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

1. Dentina esclerosada (Bovina e Humana) – Estudo comparativo. 2. Dentina esclerosada – Compostos orgânicos – Compostos inorgânicos. I. Cara, Antonio Alberto de. II. Título.

Castanho GM. Estudo comparativo *in vitro* das estruturas inorgânicas e orgânicas da dentina humana e bovina saudável e esclerosada: nanodureza, concentração de Ca e P e análise morfológica. Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Odontologia.

Aprovado em: ____/____/ 2010

Banca Examinadora

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

Julgamento: _____ Assinatura: _____

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

Julgamento: _____ Assinatura: _____

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

Julgamento: _____ Assinatura: _____

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

Julgamento: _____ Assinatura: _____

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

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

À minha família especialmente meus pais Horley e Hilda, pela educação recebida e pelos bons momentos de convivência, fundamentais para meu crescimento como ser humano

Ao meu querido companheiro, Marcio, com quem tenho dividido minha vida e que é uma das razões de todo meu empenho e esforço

AGRADECIMENTOS

Ao Departamento de Dentística da FOUSP por ter me dado esta oportunidade, na pessoa em exercício Profa. Dra. Margareth Oda.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Antonio Alberto de Cara, Toninho, pela sua humildade que nos toca a alma, pelos seus grandiosos ensinamentos dos quais nunca esquecerei e por acompanhar sempre meu desenvolvimento pessoal e profissional.

À Profa. Dra. Márcia Martins Marques pela sua contagiante forma de nos ensinar a qual faz com que tenhamos cada vez mais vontade de continuar aprendendo.

À amiga Maitê pela amizade e carinho na revisão deste trabalho.

Aos amigos Carol, Yuri, Camillinha, Sérgião, Inez e Juliana pela convivência, paciência e ajuda nos momentos difíceis.

Aos colegas do Curso de Pós-Graduação em Dentística, pela ajuda, carinho e companheirismo durante o Curso.

A todos os professores do Departamento de Dentística, pelo conhecimento transmitido.

À Profa. Dra. Maria Cecília Salvadori, professora associada do Instituto de Física – USP, pelo empenho e dedicação fundamentais para que eu pudesse realizar as nanoindentações.

Ao Prof. Dr. Nilson Cristino da Cruz, responsável pelo Laboratório de Plasmas Tecnológicos (LaPTec) da UNESP - Sorocaba, por seu valioso empenho na utilização do Nanoindentador.

Ao funcionário Vinícius do Departamento de Engenharia Metalúrgica e de Materiais da Escola Politécnica da USP, pelo apoio e auxílio na obtenção das eletromicrografias de varredura.

À Julia, do Laboratório de Anatomia Patológica, INCOR – HCFMUSP, pelo auxílio na obtenção das eletromicrografias de transmissão.

À equipe do laboratório de Biologia Celular da FMUSP, Maria Cecília, Adão, Miriam e Margot, coordenada pela Profa. Dra. Hélio, pelo precioso auxílio na preparação dos espécimes para a Microscopia de Transmissão.

Aos funcionários do Departamento de Dentística pela preciosa colaboração.

Às funcionárias do serviço de Pós-Graduação da FOUUSP, pelos irretocáveis serviços prestados.

Às bibliotecárias Vânia, Glaucia e Claudia pelo auxílio na revisão e formatação de texto.

Ao colega Helio Sebastiani, por ceder os dentes bovinos utilizados neste estudo.

Aos órgãos de fomento à pesquisa científica CAPES e FAPESP pela oportunidade e ajuda financeira.

Ao Grupo de apoio à Bioestatística (GAB) pelo auxílio na análise estatística.

Aos meus sogros, Vania e Manoel, pelo carinho, ajuda e apoio em todos os momentos.

Ao amigo Ewandro pela ajuda na utilização do programa Zotero de referências bibliográficas.

À todos que de alguma forma tiveram cada qual sua contribuição.

Se um homem tem um talento e não tem capacidade de usá-lo, ele fracassou. Se ele tem um talento e usa somente a metade deste, ele fracassou parcialmente. Se ele tem um talento e de certa forma aprende a usá-lo em sua totalidade, ele triunfou gloriosamente e obteve uma satisfação e um triunfo que poucos homens conhecerão.

Thomas Wolfe

RESUMO

Castanho GM. Estudo comparativo *in vitro* das estruturas orgânicas e inorgânicas da dentina saudável e esclerosada humana e bovina: nanodureza, concentração de Ca e P e análise morfológica [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2010.

A dentina esclerosada é um substrato comumente encontrado em pacientes idosos. No entanto, existem poucos estudos comparativos entre dentina humana e bovina esclerosadas. O objetivo deste estudo foi comparar os componentes inorgânicos e orgânicos da dentina saudável e esclerosada humana e bovina, através de cinco parâmetros: nanodureza, módulo de elasticidade, análise quantitativa da concentração de Cálcio (Ca) e Fósforo (P), densidade tubular e morfologia do colágeno. Trinta dentes humanos e 30 bovinos foram distribuídos em 4 grupos experimentais (n=15 por grupo): dentina humana saudável (DHS), esclerosada humana (DEH), bovina saudável (DBS), e bovina esclerosada (DBE). Os dentes saudáveis foram preparados na mesma altura e inclinação dos dentes esclerosados expondo níveis similares da dentina e obtendo fragmentos com 2mm de espessura. Foram realizadas 3 medições por espécime em 3 áreas pré determinadas de dentina intertubular com a utilização do Nanoindentador (carga de 500µN por 5 s). Cinco espécimes de cada grupo foram preparados para Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). Com o auxílio da Energia Dispersiva por Raios-X EDX foram obtidos os valores (em percentagem) das concentrações de Ca e P e calculada a relação Ca:P. A contagem dos túbulos por área foi realizada em todas as eletromicrografias. Após descalcificação e preparo, o restante dos espécimes foi analisado em Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET). DBS obteve maiores valores de nanodureza comparada à DBE e DHS. DHE sem diferenças com DHS e DBE (p=0,0008). DBS exibiu maiores valores de módulo de elasticidade somente comparada à DHS (p=0,000). A análise estatística não demonstrou diferenças estatisticamente significantes (p=0,71) entre as concentrações de Ca e P. Quanto à densidade tubular (número de túbulos/mm²), os grupos saudáveis foram maiores que os esclerosados e os humanos maiores que os bovinos. As fibras colágenas da DBS mostraram-se mais compactadas e mais desorganizadas que as demais. Pôde-

se concluir que apenas as concentrações de Ca e P foram similares e que as dentinas esclerosadas humana e bovina mostraram similaridade. Esta pesquisa teve suporte da Fapesp sob o número 2008/10290-8.

Palavras-chave: Dentina Esclerosada. Dentina. Bovinos. Dureza. EDX. Compostos Inorgânicos. Microscopia Eletrônica.

ABSTRACT

Castanho GM. *In vitro* comparative study of organic and inorganic components analysis of health and sclerotic human and bovine dentin: nanohardness, Ca and P concentration and morphological analysis [thesis]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2010.

The sclerotic dentin has been commonly found in elderly patients. However, there are scarce reports in the literature comparing on the use of human and bovine sclerotic dentins. The objective of this study was to compare inorganic and organic components of healthy and sclerotic dentins from human and bovine. Five parameters were analyzed: nanohardness, elastic modulus, quantitative analysis of Calcium (Ca) and Phosphorous (P) concentrations, tubular density and ultrastructural morphology. Thirty human teeth plus 30 bovine teeth were distributed in 4 experimental groups (n=15 per group): human healthy dentin (HHD), human sclerotic dentin (HSD), bovine healthy dentin (BHD) and bovine sclerotic dentin (BSD). Healthy teeth were cut in the same level and inclination of the sclerotic superficial dentins. The nanohardness and elastic modulus (GPa) of three pre determined areas of each exposed dentin was measured using a nanoindenter (500 μ N for 5s). Five samples of each group were prepared for scanning electron microscopy (SEM) examination. Energy Dispersive X-ray (EDX) was used for obtaining the Ca/P ratio. The tubular density was obtained by counting the tubules in scanning electron micrographs taken in the same magnification and work distance. Data were statistically analyzed by ANOVA complemented by the Tukey's test ($p \leq 0.05$). The ultrastructure of the dentins was observed in specimens processed for transmission electron microscopy (TEM). BHD exhibited significant higher nanohardness than BSD and HHD. HSD nanohardness was similar to those of HHD and BSD ($p=0,0008$). BHD exhibited significant higher elastic modulus than HHD ($p=0,000$). The Ca:P ratios were similar amongst all groups ($p=0.71$). The tubular densities were higher in the healthy dentins than in the sclerotic for both human and bovine. The human dentins presented higher tubular densities than bovine dentins ($p=0.000$). The intertubular dentin of BHD showed short collagen fibers distributed in a condensed fashion; whereas the other dentins exhibited well-organized long bundles of collagen fibers. It was concluded that sclerotic dentins of human and bovine share most

morphological and structural characteristics. This research was supported by Fapesp grants number 2008/10290-8.

Key-words: Sclerotic Dentin. Dentin. Bovine. Hardness. EDX. Inorganic Chemicals. Microscopy, Electron.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 4.1 - Corte paralelo do incisivo saudável (A) com a mesma inclinação encontrada no dente esclerosado (B), incisivo saudável após o corte (C) e incisivo esclerosado intacto (D)42
- Figura 4.2 - Nanoindentador Hysitron Triboindenter, Laboratório de Plasmas Tecnológicos (LaPTec) da UNESP, Sorocaba, SP, Brasil.....45
- Figura 4.3 - Imagens produzidas pelo Nanoindentador de dentina humana (A e C) e dentina bovina (B e D) antes e após a indentação. Os números indicam as áreas a serem indentadas (A e B) e no interior do círculo vermelho a área indentada (C e D)46
- Figura 4.4 - Imagem em 3D de dentina bovina esclerosada após a indentação (círculo vermelho)46
- Figura 4.5 - Imagem da dentina bovina saudável em MEV (elétrons secundários) e espectro EDX do espécime47
- Figura 4.6 - Espécime de dentina humana (A) e dentina bovina (B) após fina cobertura metálica. Em vermelho, as 3 áreas pré determinadas a serem analisadas.....49
- Figura 4.7 - A eletromicrografia ilustra a contagem dos túbulos realizada no quadro vermelho. As estrelas vermelhas indicam a contagem dos túbulos no primeiro quadrado.....50
- Figura 4.8 - Microscópio Eletrônico de Transmissão (modelo TECNAI 10), pertencente ao Laboratório de Anatomia Patológica, INCOR – HCFMUSP52
- Figura 5.1 - Eletromicrografia de varredura representativas de dentinas humanas (A-D) e bovinas (E-H), saudáveis (A, B, E, F) e esclerosadas (C, D, G, H). Observe que a densidade tubular das dentinas saudáveis são maiores que as das dentinas esclerosadas. Mais ainda a densidade tubular da dentina humana saudável é maior que a da dentina bovina saudável. Nas dentinas humanas pode-se observar com nitidez (entre setas) a

dentina peritubular e a luz dos seus túbulos parecem menores do que os das dentinas bovinas. (A, C, E e G - Aumento 2000x: barra em G= 20 μm ; B, D, F e H – Aumento de 8000x: barra em H=5 μm).....62

Figura 5.2 - Eletromicrografia de varredura representativas de dentinas esclerosadas humanas (A, B) e bovinas (C, D). No detalhe observe a dentina peritubular humana que se apresenta evidenciada, com bordos bem definidos e de aspecto circular (B). Por outro lado, na dentina bovina não se observa com nitidez a dentina peritubular. Quando o túbulo se apresenta obliterado ou semi- obliterado, como no detalhe (D) essa dentina se assemelha mais a um plug de lama dentinária do que à dentina peritubular. (A e C: Aumento 6500x: barra em C= 5 μm ; B e D– Aumento de 16250 x: barra em H=2 μm).....63

Figura 5.3 - Eletromicrografias de transmissão representativas de dentinas humanas (A-D) e bovinas (E-H), saudáveis (A, B, E, F) e esclerosadas (C, D, G, H). Observe a distribuição do colágeno de fibrilas longas organizadas em feixes que se entrelaçam de forma distinta na dentina humana saudável (B-setas), enquanto na dentina bovina saudável estas fibrilas são mais curtas e imbricadas num aspecto mais compacto (F-setas). Nas dentinas esclerosadas humanas e bovinas a matriz colagênica se apresenta de forma similar com feixes de fibrilas longas e parcialmente recobertas por mineralização (D, H-setas). (A, C, E e G – Aumento 1650x, barra em G= 10 μm ; B, D, F e H – Aumento 6200x, barra em H=2 μm).....65

LISTA DE TABELAS

Tabela 5.1 - Valores de média de desvio-padrão (dp) dos dados de nanodureza e módulo de elasticidade (em GPa) dos 4 grupos estudados	54
Tabela 5.2- Análise de variância das médias de nanodureza e módulo de elasticidade (em GPa) dos grupos experimentais obtidas no ensaio de nanoindentação.....	55
Tabela 5.3- Valores de média de desvio-padrão (dp) dos dados de Ca, P (em %) e relação Ca:P dos 4 grupos estudados	57
Tabela 5.4- Análise de variância das médias do conteúdo mineral (Ca, P, Ca:P) (em %) dos grupos experimentais obtidas pelo EDX	58
Tabela 5.5- Valores de média de desvio-padrão (dp) dos dados de densidade tubular ($\times 10^4$ túbulos por mm^2) dos 4 grupos estudados.....	59
Tabela 5.6- Análise de variância das médias da densidade tubular ($\times 10^4$ túbulos por mm^2) dos grupos experimentais obtidas pela contagem.....	59

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DA LITERATURA	19
2.1 CARACTERÍSTICAS DA DENTINA	19
2.2 TIPOS DE DENTINA	21
2.3 SUBSTRATOS DENTINÁRIOS DIFERENTES	27
2.4 PROPRIEDADES DA DENTINA	30
2.5 COMPOSIÇÃO INORGÂNICA	36
3 PROPOSIÇÃO	39
3.1 OBJETIVO GERAL	39
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	39
4 MATERIAL E MÉTODOS	40
4.1 OBTENÇÃO E SELEÇÃO DOS DENTES	40
4.1.1 Dentes Humanos	40
4.1.2 Dentes Bovinos	41
4.2 PREPARO DOS ESPÉCIMES	41
4.3 GRUPOS EXPERIMENTAIS	42
4.4 FASES EXPERIMENTAIS	43
4.4.1 Nanoindentação: dureza e módulo de elasticidade	43
4.4.2 EDX-MEV: conteúdo de Ca e P e morfologia	47
4.2.2.1 EDX-MEV: Conteúdo de Ca e P	47
4.2.2.2 MEV: Densidade tubular	49
4.2.2.3 MEV: Componentes inorgânicos	50
4.4.3 MET: componentes orgânicos	51
4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	53
5 RESULTADOS	54
5.1 NANOINDENTAÇÃO	54
5.1.1 Análise dos valores de nanodureza e módulo de elasticidade	54
5.2 EDX / MEV	57
5.2.1 Análise do conteúdo mineral superficial de Ca e P	57
5.2.2 Análise da densidade tubular	58

5.2.3 Análise descritiva dos componentes inorgânicos	60
5.3 MET	64
5.3.1 Análise qualitativa dos componentes inorgânicos	64
6 DISCUSSÃO	66
7 CONCLUSÕES	81
REFERÊNCIAS	82
APÊNDICES	92
ANEXO	101

1 INTRODUÇÃO

Contemporaneamente a população idosa aumenta em relação à população total. Segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE (1), o índice de envelhecimento aponta para mudanças na estrutura etária da população brasileira. Com os avanços da medicina e as melhorias na qualidade de vida da população, a média de vida do brasileiro tende a aumentar. De acordo com a projeção do IBGE, o país continuará adicionando anos na vida média de sua população, de modo a alcançar em 2050 o patamar de 81,29 anos, basicamente o mesmo de países como, por exemplo, Islândia e Japão.

Assim sendo, faz-se necessário incrementar os estudos para as necessidades da população de terceira idade, haja vista que a manutenção da saúde bucal bem como das suas funções é muito importante, para a saúde geral. Nesse contexto, a preservação da estrutura dental se faz necessária para uma boa mastigação, pois sabemos que a idade e algumas desarmonias oclusais podem levar a desgastes acentuados das superfícies oclusais e incisais dos dentes com a exposição de tecido dentinário. Essa situação tem se tornado frequente e se traduz pelo desgaste fisiológico e/ou patológico dos dentes, resultante do fenômeno da atrição entre os dentes associados à consistência e acidez dos alimentos. Ou ainda de hábitos parafuncionais, como o bruxismo. Nestes casos, a reabilitação oral requer procedimentos adesivos mais eficazes a fim de restaurar a anatomia dental e recuperar a dimensão vertical de oclusão (2-5).

Macroscopicamente, o produto dessa exposição crônica de dentina decorrente do desgaste de esmalte dental possui coloração caramelo-acastanhado, é brilhante e mostra-se extremamente liso o que confere um aspecto vítreo a essa estrutura. Essas características indicam um tipo de dentina denominada esclerosada ou transparente (2-4).

Ao analisar esta estrutura fisiologicamente, o processo de esclerose é uma resposta a estímulos externos e é caracterizado por contínua deposição de dentina peritubular que acompanha espontaneamente o envelhecimento dental com envolvimento não só da porção coronária como também do segmento radicular da estrutura dental (6). Esses estímulos podem ser de natureza bacteriana, química,

mecânica, ou a associação delas. Pode conter variações na composição e estrutura por apresentar em seu interior não só deposição de dentina peritubular, mas também precipitação e deposição de Cálcio no interior do túbulo, além de conteúdo intratubular de fibrilas colágenas (6-8). A presença dessa obliteração tubular causa redução da permeabilidade dentinária que interfere na formação da camada híbrida de modo a prejudicar a retenção de restaurações adesivas neste tipo de substrato (9-13).

A literatura apresenta várias situações clínicas em que este tipo de dentina está presente, como por exemplo, abaixo de lesões cariosas (14,15), em lesões cervicais não cariosas (9,16,17), ao redor da câmara e/ou canal pulpar (18), entre outras. Porém, quando se trata de lesões não cariosas, as pesquisas convergem para o estudo dessas lesões em região cervical dos dentes, e pouco tem sido comentado a respeito do desgaste crônico em bordos incisais, principalmente de pacientes idosos.

A escassez de estudos *in vitro* que utilizam dentes incisivos humanos com superfícies incisais desgastadas e esclerosadas nos leva a crer que é exatamente pela dificuldade de obtenção e padronização do tempo pós extração, devido ao número insuficiente de dentes extraídos com estas características, uma vez que os dentes têm permanecido por mais tempo na boca dos pacientes. Portanto, a necessidade crescente de substratos alternativos aos tecidos humanos para estudos *in vitro* tem sido discutida (2-4,19).

Com o intuito de se encontrar um substituto ideal em testes laboratoriais, que preencha os quesitos de fácil obtenção e possível padronização, além de minimizar problemas éticos (2,3,20), pesquisadores têm utilizado vários substratos a exemplo de pesquisas com dentes de cães (21), cabras (22), macacos (21) e bois (2,3,19,20).

Em destaque, a dentina bovina tem sido utilizada em substituição à dentina humana, pois além de apresentar uma matriz orgânica composta predominantemente de colágeno tipo I, similar à matriz dentinária humana (23), possui vantagens, como a facilidade de obtenção, armazenamento e padronização de tamanho e volume. Uma comprovação sugestiva de que os dentes incisivos bovinos podem substituir os humanos, vieram através de estudos comparativos do número e diâmetro dos túbulos dentinários entre dentes humanos e bovinos (2,20,24).

Assim sendo, o reduzido número de publicações, tratando especificamente das diferenças e semelhanças entre dentes humanos e bovinos, torna importante o conhecimento de outras características destes substratos. Não existem pesquisas relacionadas à composição orgânica, inorgânica, de nanodureza e módulo de elasticidade comparativa entre a dentina saudável e a dentina esclerosada de bordos incisais seja ela, humana ou bovina. Alguns estudos compararam a morfologia das dentinas humana e bovina saudável (20,25,26) ou humana e bovina esclerosada (2), outros comprovaram a semelhança dos valores de resistência adesiva à esses substratos (27-29), ainda que existam ressalvas quanto a isso (30).

A respeito da utilização da dentina esclerosada bovina em pesquisas laboratoriais, as investigações ainda são escassas. A dentina bovina esclerosada proveniente de animais em idade madura tem sido comparada, diante do padrão alimentar dos mesmos e do conseqüente desgaste fisiológico. Junto a isto, tem-se o aspecto clínico dos dentes bovinos provenientes de animais abatidos após 3 anos de idade, que revela desgaste do esmalte e exposição de dentina com aspecto muito similar ao aspecto da dentina esclerosada humana encontrada em bordos incisais desgastados de pacientes idosos (2-5).

Portanto, se a dentina esclerosada humana possui características de hipermineralização e resistência ao condicionamento ácido, supõe-se que a quantidade de Ca e P desse substrato sejam maiores quando comparadas à dentina saudável. Diante desse fato, a análise da composição mineral do substrato bovino, pode nos dar parâmetros para um melhor entendimento desses substratos.

E se as características entre a dentina esclerosada humana e bovina forem similares, a análise morfológica e das propriedades de dureza e módulo de elasticidade superficial, assim como a disposição das fibras colágenas neste substrato poderiam vincular o conhecimento destas estruturas com o comportamento dos materiais odontológicos, e abrir novos horizontes para a pesquisa com a utilização da dentina bovina esclerosada em testes laboratoriais.

2 REVISÃO DA LITERATURA

É importante o conhecimento das características do tecido dentinário, bem como a variação desta estrutura frente aos mecanismos fisiológicos e patológicos. Aliado a isso, a busca de substratos alternativos tornou importante o desenvolvimento de pesquisas comparativas entre espécies utilizadas no âmbito científico. Desta comparação, torna-se imprescindível o entendimento das propriedades e características comportamentais destas estruturas. Deste modo, esta revisão será dividida em diferentes tópicos.

2.1 CARACTERÍSTICAS DA DENTINA

Segundo Nanci (6), a dentina madura possui aproximadamente 70% de material inorgânico, 20% de material orgânico e 10% de água por peso, e 45%, 33% e 22%, respectivamente, por volume. A porção inorgânica consiste de sais minerais sob a forma de cristais de hidroxiapatita em que grupos de Cálcio e Fosfato se combinam para formá-los. Já a fase orgânica é composta por cerca de 30% colágeno (principalmente do tipo I e pequenas quantidades dos tipos III e V) com inclusões de lipídios, proteoglicanas e matrizes protéicas não-colagenosas (31).

As matrizes protéicas não-colagenosas ocupam o espaço entre as fibrilas colágenas e se acumulam ao longo da periferia dos túbulos dentinários. O colágeno tipo I atua como uma plataforma que acomoda uma larga proporção de mineral nos espaços vazios e poros de suas fibrilas. As matrizes protéicas regulam a deposição mineral e podem promover ou inibir esta deposição (6). Há uma variação na densidade das fibras colágenas em diferentes áreas do dente. De acordo com Marchetti et al. (32), as fibras colágenas são menos densas na dentina periférica do que em outras áreas dos dentes e essas diferenças morfológicas poderiam influenciar as características funcionais da dentina.

A dentina é uma estrutura biológica complexa, dotada de umidade própria. Apresenta túbulos ou canalículos dentinários onde em seu interior correm o fluido

dentinário e encontram-se os prolongamentos odontoblásticos que provavelmente se estendem desde o limite amelo-dentinário até a câmara pulpar. A densidade dos túbulos e sua orientação espacial variam de acordo com sua localização no dente. Há um menor número de túbulos nas proximidades da junção amelo-dentinária e um maior número próximo à polpa. Em dentina radicular a densidade tubular é menor (31).

Os túbulos dentinários são circundados diretamente por uma matriz altamente calcificada (40% mais mineralizada que a dentina intertubular) denominada dentina peritubular, formadora de suas paredes. Entre eles, evidencia-se a dentina intertubular composta por uma matriz de colágeno tipo I reforçado por cristais de apatita e enriquecido por proteínas não-colagenosas. Sua quantidade pode variar com a localização (6,33). A dentina peritubular é hipermineralizada em relação à dentina intertubular e é secretada ao longo da vida odontoblástica, isto promove uma gradual obliteração dos túbulos com a idade (33). Diferentes localizações da estrutura dental, como coroa, terço apical, médio e cervical de raiz também demonstram alteração na quantidade de túbulos sendo menores no terço apical (34).

Os cristais de apatita na dentina são bem menores que os encontrados em esmalte ($\approx 5 \times 30 \times 100\text{nm}$) (6,31). Além disso, a distribuição e as mudanças dimensionais da fase mineral da dentina humana durante a desmineralização podem ser diferentes. Kinney et al. (35) afirmaram haver diferenças entre a dentina peri e intertubular durante a desmineralização com ácido láctico em gel ($\text{pH}=4.0$). Abaixo da camada desmineralizada, houve a formação de três zonas caracterizadas por diferenças nas densidades minerais. Estas diferenças foram responsáveis pela presença de camadas parcialmente ou completamente mineralizadas. As diferenças encontradas foram explicadas pelos diferentes níveis de qualidade na difusão do ácido entre as dentinas peri e intertubular.

Para tanto, o conhecimento da estrutura dentinária e especialmente a disposição dos túbulos dentinários é essencial para o entendimento e a interpretação das investigações dos materiais adesivos. Mjor e Nordahl (36) encontraram que a densidade tubular variava estatisticamente de acordo com sua localização. O número de túbulos dentinários no meio da raiz foi significativamente menor que na coroa. A densidade dos túbulos na parte externa da dentina localizada nas cúspides foi diferente daquela na fissura oclusal. Além disso, o arranjo dos

túbulos foi particularmente profuso nas localizações onde a densidade tubular era menor, e a configuração dos túbulos revelou um complexo e abundante sistema de anastomoses entrecruzando a dentina intertubular (36).

De acordo com suas propriedades físicas, a dentina apresenta considerável elasticidade, devido ao arranjo em rede das suas fibras colágenas o qual pode ceder mediante pressões. Com isso, a dentina é capaz de amortecer as forças mastigatórias impostas sobre o esmalte, impedindo que o mesmo se frature (6). Segundo Craig e Peyton (37), seu módulo de elasticidade e sua resistência à compressão são menores comparados ao esmalte, pois a dentina é menos mineralizada e possui maior conteúdo orgânico. Sendo assim, os cristais de apatita contribuiriam para a resistência à compressão, enquanto que o colágeno seria responsável pela elasticidade e a distribuição de estresse.

A dentina é um tecido muito duro, mais que o osso e o cemento e menos que o esmalte. Esta diferença pôde ser facilmente distinguida pelas radiografias, onde a radiodensidade da dentina foi menor que o esmalte e maior que a polpa. Quanto mais translúcido o esmalte, mais deixa transparecer a cor da dentina que é mais amarelada. Sua coloração branca amarelada pode variar de acordo com a idade e de um indivíduo para outro. Dependendo da espessura de esmalte ou de injúrias causadas no dente, o tom do amarelo pode variar podendo chegar até colorações caramelo acastanhadas (6).

2.2 TIPOS DE DENTINA

Ao contrário do esmalte, a dentina é um tecido dinâmico que é modificado fisiologicamente (qualitativa e quantitativamente) ao longo dos anos, não só pela idade, mas também por alterações provenientes de processos patológicos (36). Isto evidencia o desenvolvimento de diferentes formas de dentina. Algumas das variações mais reconhecidas incluem a formação de dentina primária, secundária, reparativa ou terciária, esclerosada e/ou transparente, afetada por cárie, desmineralizada, remineralizada e hipermineralizada (31). De acordo com Stanley et al. (38), o complexo dentino-pulpar é capaz de promover reações defensivas frente a

injúrias externas e formar um tipo de dentina com alterações de componentes fundamentais e ainda ser influenciada pela idade, sexo, tipo e localização superficial destas lesões.

A variabilidade de substratos encontrados na prática clínica torna o entendimento mais complexo e por outras vezes confuso. Por isso, uma breve definição dos tipos de dentina mais presentes na literatura será descrita a seguir.

A dentina primária é formada durante o desenvolvimento dental. Seu volume e conformação refletem a forma do dente com variações de tamanho e forma de acordo com a localização do dente no arco (31).

Já a dentina secundária se desenvolve após a formação completa da raiz, representa lenta e contínua deposição de dentina pelos odontoblastos que ocorre no teto e no assoalho da câmara pulpar gerando uma redução do volume pulpar com o passar do tempo. Algumas evidências sugerem que a esclerose dos túbulos da dentina secundária (preenchimento de material calcificado) se dá de forma mais rápida e irregular quando comparado à dentina primária. Este processo tende a reduzir a permeabilidade da dentina e proteger a polpa dental (6).

A dentina terciária, que pode ser subdividida em reacionária e reparativa. É depositada em sítios específicos em resposta às injúrias sofridas pelo complexo dentino-polpa. A proporção de deposição depende do grau de injúria sofrida, sendo diretamente proporcionais (quanto maior a injúria, maior a velocidade de deposição mineral) (6). Arana-Chavez e Massa (33) acrescentam que a dentina reacionária é formada por odontoblastos originais em resposta a fenômenos de atrição, cáries ou alguns procedimentos restauradores. Sua formação está relacionada com a intensidade e duração do estímulo e seu conteúdo mineral e a matriz orgânica são similares aos encontrados na dentina primária e secundária.

Em situações onde a patologia pulpar foi mais severa, mesmo que ainda reversível, haverá formação de novas células diferenciadas em odontoblastos que formarão a dentina denominada reparativa. A dentina reparativa na maioria dos casos pode ser diferente morfológicamente da dentina reacionária (33). Segundo Stanley et al. (38), a atrição é a lesão com maior probabilidade de formar dentina reparativa. Em resposta a um mesmo estímulo, a formação de dentina reparativa pode ocorrer juntamente com a dentina esclerosada, uma não impede a outra. No

entanto, a prevalência de dentina reparativa pode ser reduzida na presença da dentina esclerosada fisiológica.

A dentina esclerosada ou esclerótica é assim denominada por possuir túbulos dentinários ocluídos por material calcificado (8,9). Quando isto ocorre, a dentina assume uma aparência vítrea e se torna translúcida. A quantidade de dentina esclerosada aumenta com a idade e mais comumente acomete o terço apical da raiz e a região mediana entre a junção amelo-dentinária e a polpa (8,10,38). No entanto, pode também estar presente logo abaixo da camada afetada por cárie (14). Além de ocorrer frente a um mesmo estímulo como é o exemplo da atrição, objeto do presente estudo (38).

A literatura está repleta de observações a respeito da esclerose dentinária. Muitas vezes, são maneiras diferentes de relatar o mesmo acontecimento. A esclerose pode ser um evento fisiológico multifatorial que acompanha espontaneamente o fechamento dos túbulos envolvendo não só a coroa, mas também a raiz e está claramente relacionada com a idade (8,17,38). Sua formação pode ser acelerada por estímulos irritativos de natureza bacteriana, química, mecânica e física, variando sua composição e sua estrutura por apresentar aposição de dentina peritubular e precipitação e/ou deposição de sais de Cálcio nos túbulos dentinários (7).

Quanto à oclusão dos túbulos dentinários, trata-se de uma resposta fisiológica descrita por contínua deposição de dentina peritubular. Nanci (6) relatou que esta oclusão pode ocorrer de outras maneiras como, por exemplo, deposição de mineral dentro do túbulo sem nenhuma formação de dentina, uma difusa mineralização que ocorre com a viabilidade do processo odontoblástico ainda presente, ou ainda, uma mineralização do processo e do conteúdo tubular e intratubular de fibrilas colágenas. Esta dentina também reduz a permeabilidade e pode prolongar a vitalidade pulpar (6,38).

Ainda assim, pode haver formações conjuntas dos diversos tipos de dentina, em que a principal resposta frente à cárie, restaurações e erosão foi a formação de dentina esclerosada seguida pela dentina reparativa como verificado no estudo de Stanley et al. (38). A dentina esclerosada não necessariamente preveniu a formação de dentina reparativa. A presença de dentina esclerosada no assoalho da câmara pulpar e no canal radicular não foi associada com a idade. E com o passar dos anos,

as raízes foram progressivamente envolvidas por dentina esclerosada do ápice à porção cervical.

Outras abordagens encontradas na literatura serão descritas a seguir. Em 2004, El-Din, Miller e Griggs (39) relataram que lesões esclerosadas não foram consideradas sensíveis, em virtude da presença de depósitos minerais que ocluem os túbulos dentinários, reduzindo a movimentação do fluido dentinário na dentina exposta. Quanto à aparência clínica da dentina esclerosada, os autores atribuíram o aspecto vítreo desse tecido a mudanças nas características ópticas do mesmo, decorrentes da própria deposição mineral. Em outros dois estudos, em dentina hiperestésica e insensível, realizados por Yoshiyama et al. (40,41) foi possível detectar alterações estruturais vistas por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV), microscopia eletrônica de transmissão (MET) e microanálise radiográfica, nas quais as áreas de dentina naturalmente insensíveis apresentaram claramente a maioria dos túbulos obliterados por cristais mineralizados de diversos tamanhos, e atrofia parcial dos processos odontoblásticos nas áreas naturalmente insensíveis.

Em dentina radicular humana, a composição mineral presente no interior dos túbulos possuiu mesmo índice de refração que a dentina intertubular. Evidências radiográficas mostraram que o material de oclusão dos túbulos é mais mineralizado que a dentina intertubular ao redor. O material presente no lúmen e a dentina peritubular apresentaram-se lisos e densamente mineralizados, no entanto não puderam ser considerados iguais, pois espaços anulares foram encontrados entre a dentina peritubular e o material de oclusão. Esta interrupção pode estar relacionada com a origem de formação destas estruturas o que resultaria em diferenças estruturais (8).

As diferenças estruturais são relatadas por diversos autores que encontraram grande variabilidade em interfaces adesivas de dentina esclerosada comparado ao substrato saudável. Somado a isto, sabe-se que a adesão é deficiente em dentina esclerosada, pois a obliteração tubular dificulta a formação de tags interferindo na formação da camada híbrida (12,13,42,43). Por isso a necessidade de mudanças em protocolos clínicos tem surgido com o intuito de melhorar e aumentar a longevidade das restaurações realizadas neste tipo de tecido (3,11,44,45).

A deficiência na adesão à dentina esclerosada cervical pode ser atribuída a vários fatores. Segundo Tay e Pashley (16), trata-se de uma superfície hipermineralizada com túbulos ocluídos por cristais minerais alinhados longitudinalmente, resistentes à ação de ácidos. Além disso, a presença de bactérias na matriz mineralizada e a baixa resistência adesiva ao processo de desnaturação da matriz colágena também prejudicariam o processo adesivo. No entanto, El Feninat et al. (46) afirmaram que a perda da resistência adesiva foi causada pelo colapso das fibras colágenas logo após a secagem em procedimentos adesivos com condicionamento ácido total e não pelo processo de desnaturação do colágeno. E que, apesar da periodicidade das fibras se manterem após a secagem, a conformação inicial do colágeno sofre rupturas pela perda de água acarretando efeitos adversos na adesão. Visto isso, Camargo (4) e Camargo et al. (3) relataram que a adesão da dentina esclerosada bovina em bordos incisais poderia ser melhorada e alcançar os mesmos valores da dentina bovina saudável modificando o tratamento de superfície.

A matriz orgânica da dentina esclerosada encontrada sob lesões cariosas pode apresentar eventuais alterações. Suppa et al. (47), em um estudo imunohistoquímico observaram que a distribuição de fibrilas colágenas e proteoglicanas é significativamente menor na dentina esclerosada do que na dentina normal. E essa redução na antigenicidade da matriz orgânica da dentina esclerosada sob lesões de cárie leva a um questionamento sobre o potencial de remineralização intrafibrilar.

Estudos em MEV e MET sobre a dentina esclerosada relataram mudanças no diâmetro e no conteúdo tubular e diversos graus de obstrução do lúmen dos túbulos (48-50). Segundo Giachetti et al. (7), há unanimidade sobre a neo-aposição de dentina tubular associada com deposição de cristais em dentina intratubular, contudo ainda não está totalmente elucidado como essa deposição ocorre. O que se sabe é que sítios de esclerose são criados nos túbulos e podem ocluí-los por completo ou deixar uma cavidade central sem oclusão. Em geral, estes sítios são circundados por uma fina espessura a qual tem tido diversas interpretações. A literatura mostra que a dentina esclerosada tem um aumento no componente mineral, mas sem esclarecer se isto é apenas pelo aumento da quantidade ou se é devido a uma hipermineralização da dentina pré-existente. Há diversas hipóteses a

respeito da gênese da dentina esclerosada. Pode se tratar de um fenômeno passivo de dissolução e precipitação ou envolvimento ativo de processos odontoblásticos (8) e polpa (7).

Resumindo a dentina esclerosada foi definida por Giachetti et al. (7) como um evento multifatorial dado por um aumento na espessura de dentina peritubular e precipitação intratubular de sais de Cálcio associados com mineralização de estruturas orgânicas presentes no lúmen.

Em dentes submetidos à atrição, a dentina esclerosada também pode sofrer um processo de oclusão tubular decorrente de um crescente acúmulo de dentina peritubular, com participação do meio oral e saliva (48). No entanto, esta deposição mineral no interior do túbulo devido à esclerose pode acontecer sob condições individuais. No caso da dentina radicular transparente sob diferentes situações (cárie, lesões de atrição e abrasão) foram observadas diferenças no formato e disposição dos cristais no interior dos túbulos (49).

Os hábitos alimentares também podem influenciar o desgaste das superfícies oclusais de incisivos permanentes. Na população japonesa, por meio de réplicas não destrutivas analisadas por MEV, Hojo (50) constatou que as áreas de abertura dos túbulos dentinários decresceram significativamente com a idade e isto pode estar associado com os hábitos alimentares da população avaliada.

A morfologia da superfície dentinária de lesões de abrasão e erosão, livres de cárie, em análise de espectroscopia fotoacústica e MEV, descrita por Mixson et al. (51) revelou alteração no conteúdo mineral. A relação mineral/proteína das amostras de dentina esclerosada sugeriu um conteúdo mineral aumentado. Em estudos por microtomografia computadorizada, a concentração mineral também foi maior na dentina esclerosada (transparente) radicular comparada à saudável. Esta elevada concentração pode estar associada com a obliteração dos túbulos dentinários. Porém, com relação ao tamanho dos cristais, estes foram menores na dentina transparente (18).

O conhecimento dessa variabilidade existente na dentina impulsionou alguns pesquisadores a quantificar de alguma forma o grau de esclerose dentinária observado macroscopicamente. A escala de esclerose dentinária da Carolina do Norte (52) é um método de diagnóstico visual que permite graduar clinicamente o grau de esclerose:

Categoria 1: não há esclerose evidente; dentina opaca e amarelo-clara ou branca, sem descoloração, pequena transparência ou translucência

Categoria 2: translucência irregular em menos de 50% da superfície

Categoria 3: transparência irregular ou translucência em mais de 50% da superfície

Categoria 4: aparência vítrea, amarelo-escura ou acastanhada (marrom claro); com a maior parte da superfície translúcida ou transparente.

2.3 SUBSTRATOS DENTINÁRIOS DIFERENTES

A disponibilidade de dentes humanos para a pesquisa científica na área Odontológica tem diminuído com o passar dos anos. Contemporaneamente, existe uma intensa preocupação das Comissões de Bioética em aprovar estudos que utilizem material biológico. Em vista disso, estudiosos têm buscado incessantemente um substituto para os dentes humanos (25,26). A literatura abrange trabalhos científicos que utilizam vários substratos alternativos como: dentes de cães (21), cabras (22), macacos (21) e bois (2,3,19,20). Não só a dificuldade na aquisição de dentes humanos é preocupante, mas também a padronização do tempo pós extração e dos procedimentos em relação aos materiais utilizados. A padronização do modo de execução do teste também tem sido discutida (53), pois a ampla variabilidade entre os substratos de um mesmo grupo pode gerar grandes interferências nos resultados científicos especialmente em testes de adesão (27).

A nossa preocupação consiste em comparar a dentina bovina com a humana, deste modo serão descritos os trabalhos que também o fizeram.

Reeves et al. (54) não encontraram nenhuma diferença significativa na microinfiltração, com a utilização de três sistemas adesivos, entre dentes humanos e bovinos e afirmaram que os resultados obtidos dão suporte ao uso dos dentes bovinos para estudos *in vitro* que utilizem a microinfiltração como metodologia.

Segundo Phrukkanon et al. (23), por apresentar uma matriz orgânica composta predominantemente de colágeno tipo I, semelhante à matriz dentinária humana, a dentina bovina vem sendo utilizada em substituição à dentina humana em testes de adesão. Baseado nisto, Schilke et al. (24), também relataram não

haver diferenças estatisticamente significantes entre dentes humanos e bovinos, ao comparar número por mm^2 e diâmetro de túbulos dentinários, e sugerem que os incisivos bovinos podem ser substitutos de molares humanos em testes de adesão. Ainda relacionado à adesão, Nakamichi et al. (29) e Saunders (28) compararam dentes humanos e bovinos e constataram não haver diferenças estatisticamente significantes na resistência de adesão à dentina utilizando esses dois tipos de dentes. Lopes et al. (55), mesmo com a utilização de dois diferentes tipos de sistemas adesivos, também não encontraram diferenças na resistência ao cisalhamento entre dentina humana e bovina.

Em estudos de adesão por meio de teste de cisalhamento e avaliação de microinfiltração, Retief et al. (19) compararam dentinas humana e bovina. Seus resultados sugeriram que o uso de dentes bovinos ao invés de humanos não deve ser recomendado para os testes descritos.

Em 2003, Anido (30) também comparou a resistência adesiva da dentina humana e bovina em três diferentes profundidades, por meio de teste de cisalhamento. O autor tinha como finalidade estabelecer uma possível relação de profundidade entre os substratos visando à substituição da dentina humana em testes de adesão. Em seus resultados, os maiores valores de resistência adesiva foram encontrados em dente humano comparado ao bovino. Para ambos os substratos, os maiores valores foram encontrados para dentina superficial, seguida da média e da profunda. Houve semelhança de comportamento entre a dentina humana superficial e a dentina bovina profunda. Isto permitiu ao autor inferir que somente a dentina bovina profunda poderia ser utilizada *in vitro* para testes de resistência adesiva. Em outro estudo comparando a profundidade de desmineralização e a espessura da hibridização entre as dentinas humana e bovina, com a utilização de dois sistemas adesivos (autocondicionante e convencional), Anido (56) observou comportamento similar durante os procedimentos adesivos, sendo a dentina bovina considerada um bom substituto em estudos laboratoriais para a avaliação dos sistemas adesivos.

Dutra-Corrêa et al. (25,26) por meio de estudos micromorfológicos em MEV e Microscópio de Luz, comparam a dentina humana e a bovina com relação ao número de túbulos dentinários e concluíram que tanto a dentina bovina quanto a humana apresentaram maior densidade tubular/área nas proximidades da polpa. No

entanto, os túbulos dentinários da dentina bovina apresentaram maior diâmetro próximo ao esmalte e menor próximo à polpa, ao contrário da dentina humana. Além disso, a distribuição da dentina intertubular bovina não foi uniforme ao longo do dente. Deste modo, os autores inferiram que se os dentes bovinos forem utilizados em incidências e profundidades aleatórias poderiam alterar os resultados, principalmente em teste de adesão e microinfiltração se os resultados forem extrapolados sem as devidas proporções para dentes humanos. A região mais similar entre os substratos foi a mediana (entre a polpa e o limite amelo-dentinário).

Em outro estudo sobre o mesmo tema, Dutra-Corrêa et al. (20) relataram que existem importantes diferenças estruturais na dentina bovina quando comparada à humana. E isto pode gerar implicações em futuros estudos caso essas observações não forem levadas em conta. Por isso, a utilização dos dentes bovinos segundo os autores deve ser realizada com cautela, de modo a selecionar as regiões em que exista maior semelhança entre os substratos.

A dentina radicular também tem sido bastante estudada. Camargo et al. (57), em estudo do número e diâmetro dos túbulos dentinários realizados em dentina radicular de dentes humanos e bovinos, concluíram que o número e o diâmetro dos túbulos foram maiores no terço cervical seguidos pelo terço médio e apical para ambos os substratos. A dentina radicular bovina de um modo geral apresentou um significativo aumento com relação ao número de túbulos dentinários quando comparada à humana, mas com relação ao diâmetro não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes.

Em estudos de densidade radiográfica, Fonseca et al. (58,59) afirmaram que os dentes bovinos possuem densidades radiográficas similares aos dentes humanos. Em 2008, Tanaka et al. (60) inferiram que a radiodensidade da dentina coronária bovina foi estatisticamente menor que a radiodensidade da dentina coronária humana. Por esta razão, estes autores acrescentaram que a utilização de dentes bovinos em estudos radiográficos *in vitro* deve ser cautelosa a fim de se evitar erros na interpretação dos resultados.

Sano et al. (61) compararam a matriz de dentina humana e bovina, mineralizada e desmineralizada, com relação às propriedades de resistência à tração e módulo de elasticidade. Os autores observaram que a presença do colágeno na matriz de dentina desmineralizada contribuiu com uma porcentagem

maior que a esperada na força de resistência à tração comparada à dentina mineralizada. O módulo de elasticidade decresceu com a desmineralização independente da espécie.

Tagami et al. (62) investigaram a permeabilidade da dentina coronária bovina. A microscopia de varredura revelou menos túbulos com diâmetro reduzido na dentina superficial do que na dentina profunda. Houve similaridade nos resultados de permeabilidade apenas entre a dentina bovina coronária e a dentina radicular humana.

Quando se trata de dentina esclerosada, há poucos estudos que compararam as dentinas esclerosadas, bovina e humana. Camargo et al. (2) e Camargo (4) por meio de análise morfológica em MEV afirmaram que a dentina exposta da superfície incisal de dentes humano e bovino apresentaram aspectos clínicos e micromorfológicos similares, que foram representados por números equivalentes de túbulos abertos/área nos dois substratos. Depois confirmados e reescritos por Cara em seus estudos (5). A quantidade de dentina sólida (em porcentagem) entre as dentinas esclerosadas (humana e bovina) também foi medida e apresentaram-se similares (63).

Com relação às propriedades mecânica de microdureza Vickers, outros autores relataram que a microdureza da dentina humana mostrou-se maior comparativamente à dentina bovina, tanto para a saudável quanto para a esclerosada (5,63,64). Enquanto que, a microdureza da dentina esclerosada foi similar à saudável tanto para dentina humana quanto para dentina bovina (5,64,65).

2.4 PROPRIEDADES DA DENTINA

O conhecimento das propriedades mecânicas e elásticas não só dos materiais restauradores, mas também do tecido dental são importantes para aumentar a longevidade do tratamento restaurador. Este conhecimento ajuda o profissional a entender e aprender a lidar com as reações dos tecidos frente às condições clínicas e prever o comportamento da interface dente/restauração (66). Desta forma, fica evidente a importância em se estudar propriedades como as de

dureza e elasticidade (67,68). Neste tópico, iremos abordar as pesquisas relacionadas a essas propriedades.

Basicamente, duas técnicas de indentação têm sido utilizadas para a medição da dureza superficial de tecidos biológicos. São elas: a microindentação, um método mais tradicional e bem estabelecido e a nanoindentação, também conhecida por ultra-microindentação, que tem emergido como uma nova técnica (69).

A combinação entre nanoindentação e MFA tem sido utilizada para determinar as propriedades mecânicas e revelar a microestrutura de tecidos biológicos (70,71). Os nanoindentadores atingem uma profundidade de indentação $0,5\mu\text{m}$ (70), enquanto que os microindentadores com pontas Vickers e Knoop geralmente atingem profundidades de $3\mu\text{m}$ ou mais (72). Por esta razão, os nanoindentadores são mais indicados e precisos em análises de pequenas profundidades. Além disso, conseguem promover leituras menos subjetivas quando comparado aos microindentadores, pois o resultado das nanoindentações é realizado pelo próprio aparelho e não pelo operador como no caso da microindentação.

A técnica básica da indentação consiste de uma ponta de diamante a qual é pressionada contra a superfície com determinada carga e duração. Para a microdureza tem-se as unidades de medida Vickers e Knoop e para a nanodureza a unidade é GPa. A principal diferença entre as duas técnicas, como o próprio nome sugere é a escala de indentação: micrometros e nanometros respectivamente. A técnica de nanoindentação é mais sensível, pois a área de atuação é bem menor (69).

Com relação à microdureza, somente a deformação plástica permanente é investigada e não há qualquer informação a respeito da resposta elástica do material. Já a nanodureza investiga tanto a deformação plástica permanente quanto o módulo de elasticidade. A aplicação e a retirada da carga são continuamente monitoradas por meio de gráficos e os dados de dureza e módulo de elasticidade são calculados a partir destes gráficos (69).

Outra vantagem da nanoindentação é que em substratos não homogêneos ou em superfícies com grau leve de rugosidade pode-se selecionar uma área plana e realizar a indentação. Porém, se a superfície for rugosa demais a leitura da nanodureza torna-se inviável. Por ser mais sensível, a nanoindentação demonstrou

claras diferenças entre as propriedades mecânicas de tecidos biológicos. Enquanto a microindentação é um método de baixo custo, mais rápido e menos sofisticado, a nanoindentação é mais precisa especialmente quando se quer estudar estruturas em escala nanométrica (69).

As propriedades mecânicas como a dureza e o módulo de elasticidade de dentina e esmalte tem sido determinada pelo uso de vários métodos de indentação (67,70,73). Nos últimos anos, publicações de propriedades mecânicas de tecidos calcificados têm sido baseadas em investigações utilizando a nanoindentação. Esta técnica tem possibilitado uma melhoria na compreensão do comportamento mecânico de tecidos duros biológicos em escalas nanométricas (74). Muitas condições patológicas afetam a estrutura dental de forma a causar danos e/ou mudanças na composição mineral e nas propriedades mecânicas e muitas vezes a técnica de nanoindentação é capaz de detectá-las. Contudo, esta técnica avalia somente as propriedades mecânicas de uma região.

Por se tratar de uma técnica de superfície muito sensível, a região deve ser preparada com muito cuidado, estar bem polida e com uma superfície satisfatoriamente plana. Diante disso, tem sido frequente a preocupação dos pesquisadores em melhorar a padronização dos preparos a fim de viabilizar as leituras (74). Uma observação realizada por Xu et al. (75) diz que dependendo do tipo de preparo e da orientação estrutural dada para o espécime, a propagação de trinca durante a indentação em esmalte e dentina pode influenciar as medidas de dureza, módulo de elasticidade e resistência à fratura. E que isto deve ser levado em conta na preparação dos espécimes em pesquisas *in vitro*.

Dentre as várias propriedades mecânicas, a dureza é uma importante característica que pode influenciar os resultados de vários estudos, principalmente quando se trata de resistência adesiva (76), pois estão fortemente relacionadas (77).

Segundo Pashley et al. (78), a propriedade mecânica de microdureza de dentina poderia ter uma relação com a densidade tubular de acordo com sua localização (do limite amelo-dentinário em direção à polpa). Em seus achados, houve uma correlação inversa estatisticamente significativa entre estas características, ou seja, à medida que a densidade tubular aumentou (próximo à polpa), diminuiu a microdureza. Porém, a dureza do substrato dentinário também

pode sofrer alteração pela característica de dureza da dentina intertubular e não pela densidade tubular propriamente dita (79).

Estudos sobre microdureza em dentina compararam esta característica em diferentes profundidades da dentina (superficial e profunda) por meio de dois tipos de indentadores (Knoop e Vickers). Para o indentador Vickers, não foi encontrada nenhuma diferença significativa, porém para a dureza Knoop, a dentina superficial obteve valores maiores que a profunda. Os autores inferiram que as diferenças na dureza dentinária podem não ser tão relevantes apesar de existirem (76). Fusayama et al. (80) também relataram que a microdureza da dentina hígida foi maior próximo à junção amelo-dentinária do que próximo à polpa. Além disso, a dureza não mudou em dentina mesmo com a presença de cáries em esmalte. E frente à invasão bacteriana, a dureza foi menor em casos agudos e maior em casos crônicos onde havia a presença de dentina secundária ou esclerosada.

Em dentina bovina normal e esclerosada de bordos incisais, Castanho et al. (64,65) e Cara (5) não encontraram diferença estatisticamente significativa entre a dureza Vickers avaliada. Uma condição que pode alterar a dureza dos tecidos dentinários é a ação de ácidos. O efeito de bebidas e alimentos ácidos na dureza de superfície da dentina, relatado por Wongkhantee et al. (81), revelaram que a exposição de alimentos e bebidas muito ácidas por determinado tempo ocasionou diminuição da dureza superficial, comprovada pelo teste de microdureza Vickers.

Alguns tecidos dentinários foram avaliados na literatura revisada, desde dentina radicular, decídua, dentina abaixo de lesões cariosas até dentinas esclerosadas por atrição como é o caso do presente estudo. A seguir serão detalhadas mais investigações pesquisadas.

Grajower et al. (82), avaliando dentina radicular esclerosada/transparente, afirmaram que a obliteração dos túbulos com material calcificado elevou a dureza Vickers da dentina e que antes da obliteração dos túbulos ocorrer (em pacientes jovens), a dentina da região apical possuiu menor dureza que a dentina próximo à coroa. Para Zheng et al. (15), tanto a camada de dentina transparente fisiológica (associadas com a idade) quanto a patológica (lesões abaixo de cárie) mostraram túbulos ocluídos. Na camada transparente fisiológica em dentina envelhecida (de pacientes entre 65-72 anos) notou-se maior dureza comparada à normal, podendo ser considerada hipermineralizada. E na camada transparente patológica de lesões

ativas, os valores de dureza e módulo de elasticidade foram menores quando comparadas às lesões estacionadas. As diferenças entre as lesões ativas e crônicas sugeriram mudanças nos constituintes orgânicos e inorgânicos durante o processo cíclico de desmineralização e remineralização.

A tecnologia da nanoindentação permitiu investigar pequenas zonas de transição como, por exemplo, dentina intertubular e peritubular. O que se tem relatado é que a dentina intertubular possui menor módulo de elasticidade, comparado ao esmalte e à dentina peritubular. Devido à concentração de fibrilas colágenas na matriz dentinária, a dentina intertubular é mais viscoelástica que o esmalte e a dentina peritubular. Há uma maior dissipação de energia quando a dentina sofre a indentação fazendo com que tenha menor propensão à fratura (71). Mais do que isso, a dentina próxima ao esmalte corresponde a um efetivo obstáculo à propagação de trincas, pois nesta localização foram detectados menores valores de dureza e módulo de elasticidade comparado a regiões mais profundas (próximo à polpa) (83).

Em tecido dentinário logo abaixo de lesões cariosas, denominado dentina transparente e/ou esclerosada, a dureza da dentina intertubular transparente foram menores comparadas à dentina não afetada pela cárie (14). Quanto à dentina peritubular, a transparente mostrou módulo de elasticidade estatisticamente menor que a peritubular normal e igual ao do conteúdo mineral presente no interior dos túbulos. A dentina intertubular associada com a transparência, por apresentar menores valores de dureza e módulo de elasticidade, não deveria ser denominada esclerosada. A presença de mineral no interior dos túbulos não interferiu nas propriedades mecânicas da dentina sendo a dentina intertubular a maior responsável pelos resultados encontrados.

Sobre as alterações estruturais de lesões cervicais de dentina esclerosada durante a desmineralização em soluções ácidas (a base de ácido cítrico), observadas em microscopia de força atômica (MFA), foi verificado que a dentina esclerosada aparentou maior oclusão tubular com depósitos cristalinos e foi mais resistente à desmineralização pelas soluções ácidas. Os resultados deste estudo sugeriram que a dentina intertubular esclerosada é alterada de alguma maneira e que por esta razão ela seja mais resistente à desmineralização. E que a formação

dessa dentina estaria associada às mudanças estruturais no lúmen dos túbulos provocados pela deposição mineral (84).

Balooch et al. (85) relataram não haver mudanças significantes na nanodureza e no módulo de elasticidade da dentina radicular (inter e peritubular) quando comparadas as dentinas saudável e transparente. O material depositado no interior dos túbulos da dentina transparente exibiu valores entre as dentinas peri e intertubular. Isto sugere que não existam grandes alterações no conteúdo mineral dessa região, uma vez que o conteúdo mineral pode estar associado às mudanças nas propriedades mecânicas. Entretanto, os autores acreditam que alguma alteração química ou estrutural possa ocorrer na dentina intertubular, tornando-a mais resistente à desmineralização. Além disso, o material depositado no interior dos túbulos teve propriedades de emissão de luz mais próxima à dentina normal do que a transparente.

As propriedades mecânicas dos tecidos dependem do grau de mineralização. No entanto, a importância do mineral intra ou extrafibrilar não tem sido bem estabelecida. Há alguma evidência de que a mineralização intrafibrilar é um contribuinte dominante para a elasticidade e a dureza dos tecidos mesmo sendo a menor fração de mineral. Balloch et al. (86) estudaram a relação entre a desmineralização intrafibrilar com relação ao perfil topográfico das fibrilas colágenas por meio de MFA. Seus achados confirmaram que o mineral está localizado em diferentes compartimentos nos tecidos mineralizados colagenosos e revelaram que o mineral intrafibrilar tem uma influência profunda na topografia das fibrilas e nas propriedades mecânicas. Este estudo conduz a uma futura evidência de que a fase mineral intrafibrilar é a maior contribuinte para a resistência dos tecidos mineralizados e que se houver remineralização ou síntese destes tecidos provavelmente dar-se-á pela cristalização nas zonas de *gap*. Além disso, segundo Kinney et al. (66), a matriz de dentina intertubular seria responsável pelo comportamento elástico da dentina e que os túbulos não teriam efeito considerável na elasticidade da dentina normal.

Em estudos com dentição decídua, também foi possível constatar correlação entre a dureza e o módulo de elasticidade com o conteúdo mineral. Nos estudos de Mahoney et al. (87), essa correlação foi positiva em esmalte e dentina. E Angker et al. em seus dois estudos (88,89), relataram que as propriedades mecânicas da

dentina decídua são dependentes do conteúdo mineral e o decréscimo dos valores de dureza e módulo de elasticidade em dentina cariada (zona desmineralizada) estão diretamente ligadas à redução do conteúdo mineral.

2.5 COMPOSIÇÃO INORGÂNICA

Tecidos mineralizados de mamíferos derivados do mesênquima são baseados na matriz de colágeno tipo I e reforçados pela incorporação de apatita mineral. A forma mineral distingue-se por dois espaços: o intrafibrilar (fibrilas colágenas preferencialmente em zonas de *gap* entre as moléculas colágenas) e o extrafibrilar (na superfície das fibrilas colágenas) (90). Cabe ressaltar que a maior parte de mineral é encontrada neste último (35).

A aplicação da análise quantitativa por raios X representa um forte método para o estudo de processos de mineralização, sendo uma ferramenta indispensável na caracterização e distribuição espacial de elementos químicos. Este método tem a vantagem de analisar a mineralização bem como definir áreas morfológicas com leituras precisas e pouca variação na determinação da concentração de elementos químicos (por exemplo, o Cálcio) do tecido de áreas bem específicas (91).

A análise por Energia Dispersiva de Raios X (EDX) é uma técnica de microanálise química usada em conjunto com MEV também conhecida como Espectroscopia de Energia Dispersiva de Raios X (EDS). Esta análise permite a identificação de elementos através de suas linhas características de raios X. Há um feixe de elétrons que é excitado e se propaga em direção à amostra fazendo a leitura dos elementos pré-estabelecidos de acordo com cada experimento (91). Na literatura, podemos encontrar outras metodologias como, por exemplo, a técnica PIXE ou a Espectroscopia de Fluorescência de Raios X (EDXRF) também para a medição de elementos químicos.

As metodologias citadas acima são encontradas em vários trabalhos científicos (92-94). Existe uma variabilidade muito grande na literatura de tecidos mineralizados analisados, mas poucos são os que tratam de dentina esclerosada principalmente de bordos incisais desgastados. A seguir, serão descritos os estudos

encontrados que utilizam como método principal a detecção de elementos químicos em tecidos biológicos.

A avaliação da proporção de Ca, P e C em pré-dentina, dentina e esmalte utilizando o método de análise EDX mostrou que as diferenças na proporção de Ca e P encontrada entre os substratos analisados estão relacionados aos diferentes mecanismos de mineralização das matrizes de esmalte e dentina. O rápido aumento do conteúdo de Ca e P na pré-dentina durante a mineralização indicou alta afinidade da matriz protéica ao Ca e P, favorecendo a formação dos núcleos na cristalização de hidroxiapatita (94).

O conteúdo químico em diferentes profundidades de lesões de cárie em dentina intertubular de molares humanos também foram medidas por meio de EDX. Diferenças significantes no conteúdo de Ca, P e C foram encontradas em todas as profundidades e a relação Ca:P foi diferente entre a dentina saudável e a desmineralizada. O menor conteúdo químico de Ca e P na dentina intertubular da zona translúcida comparada à saudável sugere que a dentina translúcida pode não ser hipermineralizada. Sua aparência translúcida indicou a mineralização intratubular da maioria dos túbulos, mas não de todos e está relacionada com as reações biológicas de defesa à cárie (92).

Em 2001, Arnold et al. (93) avaliaram o conteúdo mineral (Ca, P, Mg, O e C) de dentina saudável, desmineralizada, secundária, intratubular, peritubular e hidroxiapatita quimicamente pura por meio de MEV e EDX. A proporção de Ca:P em dentina saudável, desmineralizada, peritubular e secundária ficou dentro da proporção da hidroxiapatita, entretanto a dentina intratubular apresentou proporção de Ca:P diferente da hidroxiapatita. Como o estudo avaliou lesões de cárie ativas, o material encontrado na obstrução dos túbulos pareceu estar em formação não havendo tempo para sua completa mineralização. Com isso, afirmaram que a dentina intratubular não foi capaz de ocluir completamente os túbulos. Seu processo de mineralização foi diferente da dentina saudável sendo considerado um mineral diferente da hidroxiapatita verdadeira. Observações em microscopia de luz polarizada indicaram que a hipermineralização detectada foi principalmente devido à formação de dentina peritubular.

Hirayama (95) desenvolveu um software para a análise quantitativa das concentrações dos elementos químicos em experimentos biológicos utilizando a

metodologia EDX. O método foi aplicado em dentina coronária de dentes humanos permanentes e decíduos. As concentrações de Ca e P foram maiores em dentina peritubular comparada à intertubular em ambas as dentições (decídua e permanente). E as concentrações de Ca e P, tanto para a dentina peritubular quanto para a intertubular, foram maiores nos dentes permanentes. O software desenvolvido para este estudo pode melhorar os resultados especialmente quando se trata da microanálise de tecidos mineralizados baseada em sua ultraestrutura.

Propriedades como a resistência adesiva e a dureza de um tecido, podem estar relacionadas com a concentração de Ca. Estas correlações promovem uma intrínseca dependência da força de adesão na concentração de Ca do tecido dental, um efeito causado pela efetividade de aderência na área sólida e o estresse da contração de polimerização. Consequentemente, isto faz com que os mecanismos de adesão do esmalte e da dentina sejam controlados pelo conteúdo mineral e pela topografia superficial do dente (77).

3 PROPOSIÇÃO

Diante dos aspectos abordados na revisão da literatura, os objetivos deste estudo foram divididos em:

3.1 OBJETIVO GERAL

Comparar as dentinas saudáveis e esclerosadas de humano e de bovino

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Comparar:

- a. A dureza e o módulo de elasticidade com a utilização de Nanoindentador;
- b. O conteúdo mineral superficial de Ca e P por meio da análise de Energia Dispersiva por Raios-X (EDX) em Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV);
- c. A densidade tubular por meio da contagem de túbulos pela área.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 OBTENÇÃO E SELEÇÃO DOS DENTES

4.1.1 Dentes Humanos

Os 30 incisivos humanos utilizados neste estudo foram fornecidos pelo Banco de Dentes Humanos da Faculdade de Odontologia da USP, após aprovação deste projeto pelo Comitê de ética em pesquisa dessa faculdade (Anexo A). A seleção destes dentes se fez pelo seu aspecto macroscópico: dentes íntegros sem desgaste incisal e dentes que não apresentavam esmalte em seu bordo incisal, mas sim dentina esclerosada exposta numa área aproximada de 2mm^2 (típicos de indivíduos usualmente acima de 50 anos de idade) (2-4).

Cumprе ressaltar que o Banco de Dentes Humanos da Faculdade de Odontologia da USP trabalha dentro de normas de biossegurança estabelecidas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Os dentes doados ao Banco foram limpos com curetas periodontais para remoção do ligamento periodontal e debris aderidos e mantidos em água destilada, trocada semanalmente, em geladeira. No momento em que foram fornecidos aos pesquisadores, os mesmos mantiveram-se acondicionados em embalagens plásticas e esterilizados em autoclave.

Os quinze incisivos humanos sem sinais de desgaste tiveram a dentina exposta através de corte e apresentaram-se com características de dentina jovem: aspecto liso, coloração amarelo claro. Os outros quinze incisivos esclerosados humanos apresentaram desgaste do esmalte incisal e exposição de dentina com características macroscópicas de esclerose: aspecto vítreo, brilhante, coloração caramelo-acastanhado. Toda a obtenção e seleção dos dentes seguiu a metodologia descrita por Camargo et al. (2,3) e Camargo (4).

4.1.2 Dentes Bovinos

Foram utilizados 30 incisivos bovinos extraídos de mandíbulas de animais abatidos em frigorífico com finalidade de comercialização de carne, dos quais 15 dentes apresentavam características de esclerose, típicos de animais com idade igual ou superior a 3 anos, conforme metodologia descrita por Camargo (4). Os outros 15 dentes apresentavam-se saudáveis sem desgaste incisal, típicos de animais com idade entre 1 e 2 anos. As mandíbulas foram transportadas até o Laboratório de Pesquisa em Dentística da Faculdade de Odontologia da USP armazenados em gelo e mantidos em congelador até serem limpos. Procuramos padronizar o tempo decorrido entre a obtenção das mandíbulas e a utilização dos dentes em 1 mês.

Quando do início da pesquisa, as mandíbulas foram descongeladas em temperatura ambiente por 3 horas. Os dentes foram limpos com curetas periodontais para remoção do ligamento periodontal e debris aderidos e também foram acondicionados em embalagens plásticas e esterilizados em autoclave.

4.2 PREPARO DOS ESPÉCIMES

Inicialmente foram realizados cortes transversais na altura da junção amelo-cementária para separar as coroas das raízes dos dentes. As raízes foram estocadas para futuras pesquisas e as coroas utilizadas nos experimentos. As coroas dos dentes saudáveis foram novamente seccionadas abaixo do bordo incisal seguindo a mesma inclinação dos bordos incisais dos dentes esclerosados, de acordo com Camargo (4) e Camargo et al. (2,3). Enquanto que as coroas dos dentes esclerosados não receberam nenhum corte permanecendo com suas superfícies intactas (2-4). Ilustrada pela figura 4.1.

Figura 4.1- Corte paralelo do incisivo saudável (A) com a mesma inclinação encontrada no dente esclerosado (B), incisivo saudável após o corte (C) e incisivo esclerosado intacto (D)

Após esse procedimento, todos os espécimes foram levados à politriz (Ecomet 6, Bueller, Illinois, USA - Projeto FAPESP 03/12182-4) sob irrigação para o nivelamento da superfície incisal a ser analisada. Cabe salientar, que os espécimes saudáveis passaram por todo o processo de acabamento e polimento, enquanto que os esclerosados somente pelo polimento final.

Para o acabamento e o polimento foram utilizadas, durante 1 minuto cada, lixas d'água de granulação decrescente: 320, 400, 600, 1200, 2000 e 4000 (Bueller, Illinois, USA), obtendo-se uma superfície plana e polida. Para a realização do polimento final, foram utilizados discos de feltro (Bueller, Illinois, USA) e pasta diamantada com granulação de 1 μ m (Metadi II, Bueller, Illinois, USA) pelo mesmo tempo.

A cada troca de lixas e/ou discos de feltro, os espécimes foram lavados em água corrente e levados ao aparelho de ultra-som em 3 banhos de 20 min cada para a eliminação de resíduos superficiais que possam ter penetrado na superfície. Após o final de toda sequência, os mesmos ficaram armazenados em água destilada sob refrigeração.

4.3 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os 30 espécimes humanos e os 30 bovinos foram divididos em quatro grupos (n=15 por grupo):

- DHS: Dentina Humana Saudável. Espécimes obtidos de incisivos humanos sem sinais de desgaste;
- DHE: Dentina Humana Esclerosada. Espécimes obtidos de incisivos humanos com características de esclerose;
- DBS: Dentina Bovina Saudável. Espécimes obtidos de incisivos bovinos sem sinais de desgaste;
- DBE: Dentina Bovina Esclerosada. Espécimes obtidos de incisivos bovinos com características de esclerose.

4.4 FASES EXPERIMENTAIS

Cada grupo foi dividido novamente em outros três grupos (n=5) de acordo com a fase experimental, a saber:

- Nanoindentação: obtenção dos valores de dureza e módulo de elasticidade das dentinas;
- EDX / MEV: obtenção do conteúdo mineral superficial de Ca e P e a relação Ca:P; obtenção da densidade tubular por meio da contagem de túbulos e descrição dos componentes inorgânicos;
- MET: descrição dos componentes orgânicos.

A seguir, encontram-se descritos os passos operatórios de cada fase.

4.4.1 Nanoindentação: dureza e módulo de elasticidade

Nesta fase da metodologia, cinco espécimes de cada grupo foram submetidos ao teste de nanoindentação. Dos mesmos espécimes foram obtidos os dados de dureza e do módulo de elasticidade. O equipamento dispensa preparos na amostra, como desidratação, exposição ao vácuo ou cobertura com películas condutoras. É um procedimento não-destrutivo, porém o espécime precisa estar bem polido. O polimento é necessário para garantir que a superfície seja perpendicular à ponta de

indentação e, desta forma, garantir que toda a superfície da ponta esteja sempre em contato com o material. Além disso, um bom polimento facilita a obtenção de imagens com melhor definição (69). Portanto, após o polimento descrito anteriormente (item 4.2), os dentes passaram por uma nova seqüência de polimento com pastas diamantadas mais finas de 0,5 e 0,25 μ m (Metadi II, Bueller, Illinois, USA) pelo mesmo tempo.

A partir daí, foram obtidos fragmentos de aproximadamente 1mm de espessura e até no máximo 6mm de diâmetro, com o auxílio de discos diamantados e levados novamente em banhos de ultra-som – 3 banhos de 20min cada. As dimensões descritas foram compatíveis com a área do equipamento destinado à inserção de cada espécime. A espessura dos fragmentos foi medida por meio de paquímetro digital com resolução de 0,01mm/0,0005” (Mitutoyo Sul Americana Ltda – SP, Brasil - Projeto FAPESP 05/04701-7). Os mesmos foram armazenados em água destilada sob refrigeração, estando prontos para o momento da leitura. As leituras foram realizadas sob condição ambiental (71) e de forma seqüencial.

O principal objetivo de medidas de nanoindentação é a determinação da dureza e do módulo de elasticidade de camadas superficiais de sólidos. Para as medições de dureza, uma carga é aplicada ao indentador (tipicamente uma ponta de diamante com forma piramidal) em contato com a superfície da amostra. Este processo é delineado em três etapas. Inicialmente, uma carga é aplicada com uma taxa pré-determinada até atingir um valor máximo. Depois disto, a força é mantida constante por um determinado intervalo de tempo para que haja a acomodação do material. E por fim, a carga é controladamente retirada e o indentador removido da amostra (96).

Quando esta carga é removida do indentador, o material tenderá retornar à sua forma original. No entanto, muitas vezes ele é impedido de fazê-lo devido a deformações plásticas sofridas durante o processo de carga. Porém, devido ao relaxamento das tensões elásticas no material, pode ocorrer algum grau de recuperação elástica. A análise desta recuperação após a retirada da carga fornece uma estimativa do módulo de elasticidade da amostra. Uma vez conhecida a profundidade de contato (ou profundidade plástica) e a geometria do indentador, determina-se a área projetada e a área da indentação quando a carga era a máxima. Com estes dados, é possível obter os valores da dureza do material por meio de

fórmulas matemáticas ($H = P_{max}/A$, onde H é a dureza, P_{max} é a carga máxima atingida pela indentação e A é a área projetada após a deformação plástica) (96).

O equipamento utilizado foi o nanoindentador Hysitron modelo TriboIndenter, pertencente ao Laboratório de Plasmas Tecnológicos (LaPTec) da Universidade Estadual Paulista, Campus Experimental de Sorocaba, SP, Brasil (Figura 4.2).

Figura 4.2 - Nanoindentador Hysitron Triboindenter, Laboratório de Plasmas Tecnológicos (LaPTec) da UNESP, Sorocaba, SP, Brasil

Para a nanoindentação, foi utilizada uma função de carga trapezoidal com tempo de carga e descarga de 5 segundos e tempo de residência de 10s. Foram selecionadas três áreas de $23 \times 23\mu\text{m}$ por espécime e realizadas 3 indentações por área em dentina intertubular (totalizando cerca de 9 indentações por espécime). A carga empregada pelo equipamento foi de $500\mu\text{N}$ a uma distância mínima de 1 a $2\mu\text{m}$ entre as indentações para evitar a sobreposição de áreas vizinhas (71).

O equipamento utilizado possibilita a produção de imagens que são necessárias quando se trabalha em regiões na ordem de nanômetros como é o caso da dentina intertubular. Desta maneira, consegue-se definir mais precisamente a área a ser indentada e depois checar a indentação realizada. A figura 4.3 ilustra espécimes de dentina humana e bovina com a pré-determinação das áreas a serem indentadas (A e B) e após a indentação (C e D). Além disso, foram obtidas imagens em 3D para ilustrar a marca da indentação como mostra a figura 4.4 em dentina bovina esclerosada.

Figura 4.3 – Imagens produzidas pelo Nanoindentador de dentina humana (A e C) e dentina bovina (B e D) antes e após a indentação. Os números indicam as áreas a serem indentadas (A e B) e no interior do círculo vermelho a área indentada (C e D)

Figura 4.4 – Imagem em 3D de dentina bovina esclerosada após a indentação (círculo vermelho)

Os dados gerados pelo equipamento foram obtidos com base no método desenvolvido por Oliver e Pharr (97). Os valores finais de dureza e módulo de elasticidade foram dados em GPa e posteriormente tabulados para a análise estatística (Apêndices A, B, C e D).

4.4.2 EDX-MEV: conteúdo de Ca e P e morfologia

4.4.2.1 EDX-MEV: Conteúdo de Ca e P

Para esta fase do estudo, foi utilizado o microscópio Philips XL 30 (Reston, Virginia, USA) do Departamento de Engenharia Metalúrgica e de Materiais da Escola Politécnica da USP, São Paulo, SP, Brasil. A avaliação do conteúdo mineral presente nos substratos, realizada pelo equipamento EDX-MEV, permite a identificação de elementos através de suas linhas características de raios X (91). A excitação é efetuada pelo feixe de elétrons que incide sobre a amostra, com energias típicas da ordem de 20keV. Um exemplo deste tipo imagem e do espectro alcançado é mostrado na Figura 4.5.

Figura 4.5 - Imagem da dentina bovina saudável em MEV (elétrons secundários) e espectro EDX do espécime

Foram utilizados cinco dentes de cada grupo. Todos os dentes foram seccionados a 2mm de distância do bordo incisal, paralelamente ao mesmo, por meio de disco diamantado dupla-face periférico (Vortex Ind. E Com. De Ferramentas Diamantadas Ltda, Brasil) montado em mandril para contra-ângulo de baixa-rotação (N270, Dabi Atlante – SP, Brasil), para obtenção de fragmentos de 2mm de espessura. A espessura dos fragmentos foi medida por meio de paquímetro digital com resolução de 0,01mm/0,0005” (Mitutoyo Sul Americana Ltda – SP, Brasil - Projeto FAPESP 05/04701-7). Todo cuidado foi tomado para que os fragmentos tivessem a mesma espessura (2mm) ao longo de todo o bordo incisal para facilitar a desidratação, passo subsequente para a análise em MEV.

Como o aparelho trabalha em atmosfera sob vácuo, é importante que fosse removida toda a água contida nos espécimes. Para a desidratação dos espécimes, todos os fragmentos foram preparados através da sequência: fixação em solução de glutaraldeído a 2,5% em tampão fosfato por 2 horas; 3 lavagens de 5 min cada com solução tampão fosfato 0,1M; desidratação através de duas imersões de 5 min cada em álcool sequencialmente: 30%, 50%, 70%, 90%, 96% e, por fim, quatro imersões de 5 min cada em álcool absoluto; imersão em hexamethyldisilazane (HMDS); e secagem por 2 horas em capela para evaporação do HMDS.

Os espécimes foram manipulados com luvas de vinil e pinça clínica sem haver toque nas superfícies analisadas. Desse modo, certificamo-nos de que não houve nenhum tipo de interação com compostos químicos presentes nas luvas de procedimentos, ou mesmo nas mãos do operador.

A seguir, os espécimes foram colados em stubs metálicos por meio de uma fita de carbono adesiva dupla face (Nisshin Em Co., Ltd. Tokyo) e cobertos por uma fina película de ouro. Após a metalização, ficaram armazenados em câmara de vácuo até o momento da análise.

Com as amostras inseridas no microscópio foi possível em menor aumento delimitar quais as áreas a serem examinadas. Foram demarcadas três áreas para cada espécime. A primeira área foi registrada na região central tanto no sentido mesio-distal quanto no sentido vestibulo-lingual. As duas outras áreas foram registradas equidistantes do centro e dos extremos proximais do dente: uma em direção à face mesial e uma em direção à face distal (2) como ilustrado na figura 4.6.

Figura 4.6 – Espécime de dentina humana (A) e dentina bovina (B) após fina cobertura metálica. Em vermelho, as 3 áreas pré determinadas a serem analisadas

As eletromicrografias analisadas nesta fase do estudo tiveram aumento de 2000x com mesma distância focal. Para cada espécime, foram realizadas três leituras e calculada a média entre elas, de modo a termos uma medida por espécime. Portanto, cada grupo apresentou cinco medidas de Ca e P (n=5). Essas medidas, dadas por porcentagem em peso, foram distribuídas em tabelas para a análise estatística (Apêndice E).

4.4.2.2 MEV: Densidade tubular

A densidade tubular consistiu na contagem dos túbulos abertos por área de dentina. A área de cada imagem analisada correspondeu a $104,34 \times 78,26 \mu\text{m}$, isto é, $8.165,64 \mu\text{m}^2$ ou $0,0081\text{mm}^2$. Foram analisadas 15 imagens de cada grupo, de modo a termos 15 valores para cada grupo (Apêndice F).

Essa contagem de túbulos foi realizada de acordo com a metodologia de Feist et al. (98). Cada imagem recebeu uma grade com 12 quadrados onde foram realizadas as contagens e anotadas manualmente. Todo túbulo dentinário que apresentava uma luz definida e visível em seu interior foi marcado. A grade proporcionou uma contagem mais precisa já que era realizada em um espaço pequeno. Cada túbulo contado foi marcado com caneta vermelha para não correr o

risco de contar duas vezes o mesmo túbulo. Caso houvesse dúvida era possível revisar apenas o quadrado recém riscado. A figura 4.7 ilustra como foi realizada a contagem.

Figura 4.7 – A eletromicrografia ilustra a contagem dos túbulos realizada no quadro vermelho. As estrelas vermelhas indicam a contagem dos túbulos no primeiro quadrado

4.4.2.3 MEV: Componentes inorgânicos

Outras análises de superfície foram realizadas com a finalidade de fornecer mais detalhes, auxiliar a compreensão dos resultados e enriquecer a discussão do presente estudo. Assim, foram analisadas ao MEV eletromicrografias em diferentes aumentos:

- Eletromicrografias dos quatro grupos envolvidos (DHS, DHE, DBS e DBE) com aumentos de 2000 e 8000x;
- Eletromicrografias dos grupos esclerosados (DHE e DBE) com aumentos de 6500 e 16250x, preparadas conforme descrito pelo item 4.4.2.1.

4.4.3 MET: componentes orgânicos

Essa fase foi importante na avaliação do padrão da trama colágena presente nos quatro tipos de dentinas estudadas. Foi utilizado um total de vinte dentes, cinco para cada grupo (n=5). Os dentes foram cortados em fragmentos cerca de 1mm de espessura tomando-se o cuidado de remover também com discos diamantados em baixa-rotação todo o esmalte que envolvia o fragmento dental de modo a obter-se apenas fragmentos de dentina. Estes fragmentos foram inspecionados visualmente com auxílio de lupa estereoscópica (Modelo ST-PZ, Olympus Corporation, Japão) e iluminação artificial, a fim de verificar se havia sido removido todo o esmalte circundante.

Em seguida, os espécimes passaram pelos procedimentos de descalcificação e fixação. Foi realizado um piloto para verificar qual seria o tempo exato de descalcificação para os espécimes preparados. O tempo determinado para a descalcificação em ácido fórmico (98-100%) foi de 7 dias.

Para o procedimento de descalcificação, cada fragmento ficou imerso em ácido fórmico (98-100%) durante 7 dias. Após a remoção do fragmento do ácido fórmico, o mesmo foi cortado em tiras com o auxílio de uma lâmina de bisturi para a posterior lavagem e fixação. Sendo assim, 2 lavagens com solução tampão fosfato 0,1M seguidas de centrifugação foram realizadas. E para a fixação, foi utilizado o glutaraldeído 2% por duas horas, seguida de 3 lavagens com solução tampão fosfato 0,1M sem centrifugação.

Os espécimes então foram levados ao Laboratório de Biologia Celular da Faculdade de Medicina da USP para o término do processamento. Passaram pelo procedimento de pós-fixação em tetróxido de ósmio 1% por 1 hora, seguido de 3 lavagens com solução de cloreto de sódio mais sacarose, seguidas de imersão em acetato de uranila 1% por 12 horas. Após isto, os espécimes passaram pelo processo de desidratação, infiltração e inclusão. O material foi então desidratado em séries crescentes de acetona (1 banho de acetona 30°, 10 min; 1 banho de acetona 70°, 10 min; 1 banho de acetona 95°, 15 min; e, por fim, 2 banhos de acetona 100°, 15 min cada). E para o procedimento de infiltração, foi acrescentada uma mistura de acetona mais resina (1/2:1/2) no girador por 3 horas; em seguida, todo o excesso foi

removido e acrescentou-se resina pura, ficando em estufa a 37° por 1 hora. Após isto, a inclusão do material foi realizada em forminhas com resina pura permanecendo em estufa a 60° por 3 dias.

Após a polimerização da resina, os blocos foram cortados com o auxílio de um ultramicrotomo (Leica ULTRACUT UCT®) em cortes mais grossos para o preparo das lâminas, as quais foram coradas com azur 2 e azul de metileno. A partir de então, as lâminas foram visualizadas em Microscópio óptico (Modelo CH2, Olympus Corporation, Japão) para a definição das áreas de leitura. Definidas as áreas, foram obtidas secções ultrafinas de aproximadamente 300nm de espessura, com o auxílio de uma navalha de diamante montada em ultramicrotomo (Leica ULTRACUT UCT®), as quais foram contrastadas com citrato de chumbo por 10 min e examinados em Microscópio Eletrônico de Transmissão (modelo TECNAI 10, Philips, Holanda FEI Company), pertencente ao Laboratório de Anatomia Patológica do Instituto do Coração, INCOR – HCFMUSP (Figura 4.8). As imagens obtidas foram analisadas por um Software de análise de imagens (programa AnalySIS – Soft Imaging Sistem GmbH, Alemanha). As eletromicrografias de transmissão foram avaliadas qualitativamente em função da distribuição das fibras colágenas de acordo com cada tipo de dentina.

Figura 4.8 - Microscópio Eletrônico de Transmissão (modelo TECNAI 10), pertencente ao Laboratório de Anatomia Patológica, INCOR – HCFMUSP

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

De acordo com a disposição dos dados, para a análise estatística, foi proposta comparações entre os quatro grupos estudados, nas 3 fases experimentais, com as seguintes combinações:

- DHS versus DBS
- DHS versus DHE
- DHE versus DBE
- DBS versus DBE

Para as fases 1 e 2, os dados numéricos obtidos foram inicialmente avaliados quanto a sua distribuição e homogeneidade. Para isso foi aplicado inicialmente o teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov. Definida a possibilidade de aplicação de estatísticas paramétricas, foi eleito o teste de variância ANOVA. E como teste estatístico complementar foi utilizado o teste Tukey, a fim de detectar entre quais médias de cada grupo havia diferenças estatisticamente significantes. O nível de significância adotado foi de 5% ($p < 0,05$).

Ainda na fase 2, foram avaliadas qualitativamente a morfologia superficial de cada grupo das eletromicrografias obtidas em MEV, conforme a disposição das dentinas peritubular, intertubular e oclusão dos túbulos dentinários. E na fase 3, as eletromicrografias de transmissão foram avaliadas também qualitativamente em função da distribuição das fibras colágenas de acordo com cada tipo de dentina.

Nas 3 fases descritas, pretendeu-se avaliar as semelhanças e/ou diferenças entre os substratos. Em outros termos, tivemos a intenção de analisar os diferentes aspectos descritos de acordo com cada metodologia proposta, na tentativa de validar a dentina bovina como uma alternativa confiável para pesquisas laboratoriais.

5 RESULTADOS

5.1 NANOINDENTAÇÃO

5.1.1 Análise dos valores de nanodureza e módulo de elasticidade

Foram analisados 20 valores de dureza e 20 do módulo de elasticidade, obtidos pelo teste de nanoindentação. Esses valores foram decorrentes da média dos valores, tanto de dureza como do módulo de elasticidade, obtidos para cada espécime testado, divididos em 4 grupos (n=5) (Apêndice A, B, C e D).

Para caracterizar a amostra estudada, a tabela 5.1 ilustra a estatística descritiva (valores de média e desvio padrão) para os dados obtidos entre os 4 grupos analisados.

Tabela 5.1- Valores de média e desvio-padrão (dp) dos dados de nanodureza e módulo de elasticidade (em GPa) dos 4 grupos estudados

	Grupos	DHS	DBS	DHE	DBE
	n	5	5	5	5
Nanodureza	Média ± dp	0,27±0,15	0,75±0,20	0,31±0,07	0,43±0,15
Módulo de elasticidade	Média ± dp	9,39±5,69	23,55±4,97	11,71±3,42	16,43±4,87

A análise de variância mostrou resultados significantes ao nível de 5% ($p < 0,05$) para as médias, tanto de dureza, quanto do módulo de elasticidade, obtidas nos quatro grupos experimentais (vide tabela 5.2).

Tabela 5.2 – Análise de variância das médias de nanodureza e módulo de elasticidade (em GPa) dos grupos experimentais obtidas no ensaio de nanoindentação

	Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Grau de Liberdade	Quadrados Médios	F	p
Nanodureza	Grupos	0,729	3	0,243	10,254	0,0008
	Resíduo	0,379	16	0,024		
Módulo de elasticidade	Grupos	585,852	3	195,284	8,421	0,0017
	Resíduo	371,002	16	23,188		

Para detectar onde as diferenças significativas ocorreram, foi realizado o teste de Tukey. As comparações fornecidas pelo teste de Tukey evidenciaram diferenças com $p < 0,05$. O gráfico 5.1 ilustra os resultados de dureza e módulo de elasticidade, onde as barras indicam o desvio padrão da média e letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes.

Gráfico 5.1 – Comparação das médias de nanodureza entre os quatro grupos experimentais. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes

Gráfico 5.2 – Comparação das médias de módulo de elasticidade entre os quatro grupos experimentais. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes

Pela análise do gráfico 5.1, considerando-se que semelhanças estatísticas estão indicadas pela mesma letra, observa-se que maiores valores médios de nanodureza, foram encontrados para o grupo da dentina bovina saudável (DBS), comparativamente aos demais grupos, sejam eles, da mesma espécie (DBE) ou do mesmo substrato (DHS). Os demais grupos não tiveram diferenças estatisticamente significantes entre si quanto à nanodureza. Na análise do gráfico 5.2, com relação ao módulo de elasticidade, a dentina bovina saudável (DBS) só teve valores estatisticamente maiores quando comparada à dentina humana saudável (DHS). O restante dos grupos não diferiu estatisticamente nesta característica.

Observa-se que o comportamento dos grupos das dentinas esclerosadas - humana e bovina - foi semelhante estatisticamente, isto é, apresentaram valores médios de nanodureza e módulo de elasticidade semelhante quando comparados entre si; desta maneira, não houve diferenças entre as espécies quando a dentina esclerosada foi analisada. Já a dentina saudável humana teve valores estatisticamente inferiores às médias das mesmas características físicas da dentina bovina saudável, ou seja, as dentinas saudáveis diferiram entre si de uma espécie para a outra, tendo a dentina bovina maiores valores de nanodureza e módulo de elasticidade comparada à humana.

Também é possível observar que entre as espécies, os grupos das dentinas humanas - esclerosada e saudável - apresentaram valores médios de nanodureza e módulo de elasticidade estatisticamente semelhante entre si, não apresentando diferenças quanto ao substrato analisado (esclerosado ou não). Enquanto que na comparação entre as dentinas bovinas, a saudável apresentou valores estatisticamente superiores de nanodureza quando comparada à esclerosada; e valores estatisticamente semelhantes de módulo de elasticidade.

5.2 EDX / MEV

5.2.1 Análise do conteúdo mineral superficial de Ca e P

Para a análise do conteúdo mineral de Ca e P e a relação Ca:P, foram coletados 45 valores, sendo 15 referentes à percentagem em peso de Ca, outros 15 de P e mais quinze da relação Ca:P. Foi obtida uma média aritmética simples das 3 regiões selecionadas de cada espécime de maneira a obtermos 5 valores (1 para cada espécime) (n=5) (Apêndice E).

A tabela 5.3 ilustra a estatística descritiva para os dados do conteúdo mineral (Ca e P) e a relação Ca:P obtidos entre os 4 grupos experimentais.

Tabela 5.3 – Valores de média e desvio-padrão (dp) dos dados de Ca, P (em %) e relação Ca:P dos 4 grupos estudados

	Grupos	DHS	DBS	DHE	DBE
	N	5	5	5	5
Ca	Média ± dp	68,33±0,28	68,05±0,20	68,03±0,29	68,18±0,05
P	Média ± dp	31,66±0,28	31,94±0,20	31,96±0,29	31,81±0,05
Ca:P	Média ± dp	2,15±0,05	2,13±0,04	2,13±0,05	2,14±0,02

A análise de variância mostrou não haver diferenças estatisticamente significantes ao nível de 5% ($p < 0,05$) para as médias do conteúdo mineral obtido nos quatro grupos experimentais. Os valores de p foram maiores que 0,05 (Tabela 5.4).

Tabela 5.4 – Análise de variância das médias do conteúdo mineral (Ca, P, Ca:P) (em %) dos grupos experimentais obtidas pelo EDXA

	Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Grau de Liberdade	Quadrados Médios	F	p
Ca	Grupos	0,28	3	0,09	0,45	0,71
	Resíduo	3,32	16	0,20		
P	Grupos	0,28	3	0,09	0,45	0,71
	Resíduo	3,32	16	0,20		
Ca:P	Grupos	0,00	3	92,2 e -05	0,45	0,72
	Resíduo	0,03	16	0,00		

De acordo com os resultados, não existiram evidências para rejeitarmos a hipótese de igualdade entre as médias dos quatro grupos comparados. Desta forma, o conteúdo mineral (Ca e P) e a relação entre eles (Ca:P) não foram diferentes, tanto entre a dentina humana e bovina, como entre a saudável e a esclerosada, independentemente da espécie e do substrato.

5.2.2 Análise da densidade tubular

Foram utilizadas 60 eletromicrografias para a contagem dos túbulos, quinze para cada grupo. As densidades foram calculadas dividindo o número de túbulos pela área disponibilizada na eletromicrografia (Apêndice F).

A estatística descritiva para os dados da densidade tubular obtidos entre os 4 grupos experimentais encontra-se na tabela 5.5. E o resultado da análise estatística está demonstrado na tabela 5.6.

Tabela 5.5 - Valores de média e desvio-padrão (dp) dos dados de densidade tubular ($\times 10^4$ túbulos/mm²) dos 4 grupos estudados

GRUPOS	DHS	DBS	DHE	DBE
n	15	15	15	15
Média±dp	4,5±0,59	3,67±0,54	2,9±0,78	1,88±0,68

Tabela 5.6 – Análise de variância das médias da densidade tubular ($\times 10^4$ túbulos/mm²) dos grupos experimentais obtidas pela contagem

	Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Grau de Liberdade	Quadrados Médios	F	p
Densidade tubular	Grupos	52,537	3	17,512	40,426	0,0001
	Resíduo	22,526	52	0,433		

De acordo com os resultados, pôde-se observar que houve diferenças estatisticamente significantes entre todos os grupos, confirmadas pelo teste de Tukey. Conforme ilustrado no gráfico 5.2, os 4 grupos experimentais apresentaram variação. A densidade tubular da DHS foi a maior de todas seguidas pelas DBS, DHE, e DBE, respectivamente. Os resultados indicaram que as dentinas saudáveis (DHS e DBS) tiveram valores maiores de densidade tubular que as esclerosadas (DHE e DBE), tanto na comparação entre as dentinas humanas quanto entre bovinas. Na comparação entre as dentinas humanas, a saudável (DHS) foi maior que a esclerosada (DHE) e entre as bovinas ocorreu o mesmo resultado (DBS maior que DBE).

Gráfico 5.3 – Comparação das médias de densidade tubular entre os quatro grupos experimentais. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes

5.2.3 Análise descritiva dos componentes inorgânicos

A figura 5.1 permite observar comparativamente o aspecto morfológico das dentinas humana e bovina, saudável e esclerosada dos quatro grupos experimentais.

As eletromicrografias à esquerda da figura 5.1, designadas pelas letras A, B, C e D, são dentina humana, enquanto que as eletromicrografias da direita, designadas pelas letras E, F, G e H são de dentina bovina.

Observando-se o aspecto morfológico das dentinas saudáveis: humana (A e B) e bovina (E e F), sem características de esclerose, notaram-se túbulos dentinários expostos transversalmente, com luz evidente, em ambos os substratos. Notou-se que a densidade tubular da humana foi maior que a da bovina, comprovada estatisticamente pela análise anterior. Em maior aumento (B e F), observou-se que a luz do túbulo pareceu ter maior diâmetro na bovina que na humana. Além disso, a dentina peritubular pareceu mais evidente na dentina humana com a formação de um arco ao redor do túbulo como demonstrado pelas setas em B.

Entre as dentinas humanas, saudável (A e B) e esclerosada (C e D), notou-se maior densidade tubular na saudável com a presença de túbulos mais abertos e evidentes comparados à esclerosada. Na humana esclerosada, observou-se um alo de dentina peritubular mais evidente e mais espesso que a saudável notando-se uma maior obliteração tubular especialmente pela formação de dentina peritubular que avançou em direção ao interior dos túbulos.

Quanto às dentinas esclerosadas, a análise superficial tanto humana (C e D) quanto bovina (G e H) revelou evidente obliteração tubular. A densidade tubular continuou sendo maior na humana e a redução no diâmetro dos túbulos dentinários pareceu ser mais acentuada na humana comparada à bovina. Isto também foi comprovado pelos achados da análise anterior de contagem de túbulos. Na dentina esclerosada humana, notou-se no maior aumento (D) uma maior evidência de dentina peritubular formando um aspecto circular nítido ao redor dos túbulos, chegando a obliterá-los em vários pontos. Enquanto que na dentina esclerosada bovina, essa obliteração revelou uma cobertura dos túbulos dentinários por deposição de material muito semelhante à dentina intertubular verificado no maior aumento (H) e não foi possível verificar a presença de dentina peritubular visível na eletromicrografia.

O aspecto morfológico das dentinas bovinas, saudável (E e F) e esclerosada (G e H), mostrou similaridade com relação à presença de dentina peritubular, o diâmetro dos túbulos pareceu semelhante, no entanto, a dentina esclerosada mostrou maior obliteração. Notou-se maior espaçamento entre a luz dos túbulos e a cobertura dos túbulos mostrou um aspecto similar ao da dentina intertubular sem a presença nítida de dentina peritubular.

A figura 5.2 mostrou maiores detalhes na visualização das dentinas esclerosadas, humana (A e B) e bovina (C e D). Pôde-se observar que em ambas as dentinas houve evidente obliteração tubular, porém de maneiras distintas, em que a obliteração tubular da primeira se mostrou pela deposição de dentina peritubular a qual avançou para dentro do túbulo conforme maior aumento em B. Já na dentina bovina (D) essa obliteração pareceu similar a um esfregaço de lama dentinária e não houve evidências de formação de dentina peritubular. Além disso, o maior diâmetro da luz dos túbulos continua sendo o da dentina bovina comparada à humana.

Figura 5.1 - Eletromicrografia de varredura representativas de dentinas humanas (A-D) e bovinas (E-H), saudáveis (A, B, E, F) e esclerosadas (C, D, G, H). Observe que a densidade tubular das dentinas saudáveis são maiores que as das dentinas esclerosadas. Mais ainda a densidade tubular da dentina humana saudável é maior que a da dentina bovina saudável. Nas dentinas humanas pode-se observar com nitidez (entre setas) a dentina peritubular e a luz dos seus túbulos parecem menores do que os das dentinas bovinas. (A, C, E e G – Aumento 2000x, barra em G= 20 μ m; B, D, F e H – Aumento 8000x, barra em H=5 μ m)

Figura 5.2 - Eletromicrografia de varredura representativas de dentinas esclerosadas humanas (A, B) e bovinas (C, D). No detalhe observe a dentina peritubular humana que se apresenta evidenciada, com bordos bem definidos e de aspecto circular (B). Por outro lado, na dentina bovina não se observa com nitidez a dentina peritubular. Quando o túbulo se apresenta obliterado ou semi-obliterado, como no detalhe (D) essa dentina se assemelha mais a um plug de lama dentinária do que à dentina peritubular. (A e C – Aumento 6500x, barra em C= 5 μ m; B e D– Aumento 16250x, barra em H=2 μ m)

5.3 MET

5.3.1 Análise qualitativa dos componentes orgânicos

A figura 5.3 ilustra as eletromicrografias de transmissão representativas de dentinas humanas (A, B, C e D) e bovinas (E, F, G e H), saudáveis (A, B, E e F) e esclerosadas (C, D, G e H). Observou-se que a trama colágena na dentina humana saudável (A e B) possui fibrilas longas e organizadas em feixes que se entrelaçam de forma distinta conforme foi mostrado pelas setas no maior aumento (B). Já na dentina bovina saudável (E e F) essas fibrilas apresentaram-se mais curtas e imbricadas de forma a evidenciar um aspecto mais compactado visualizado pelo maior aumento (F). Nesta estrutura não foi possível visualizar fibras longas, apenas fibras curtas indicadas pelas setas com maior espaço entre elas. O aspecto visual da DBS mostrou desorganização fibrilar (F-setas).

Nas dentinas esclerosadas humanas (C e D) e bovinas (G e H), observou-se uma matriz de colágeno ainda mais organizada com aspectos similares. Os feixes de fibrilas encontraram-se mais longos e em alguns pontos foi possível visualizar alguns focos de mineralização entre as fibras (tons cinza escuro). O aspecto da trama colágena pareceu mais organizado e menos compactado. As setas no maior aumento (D e H) indicaram o comprimento das fibrilas.

Figura 5.3 - Eletromicrografias de transmissão representativas de dentinas humanas (A-D) e bovinas (E-H), saudáveis (A, B, E, F) e esclerosadas (C, D, G, H). Observe a distribuição do colágeno de fibrilas longas organizadas em feixes que se entrelaçam de forma distinta na dentina humana saudável (B-setas), enquanto na dentina bovina saudável estas fibrilas são mais curtas e imbricadas num aspecto mais compacto (F-setas). Nas dentinas esclerosadas humanas e bovinas a matriz colagênica se apresenta de forma similar com feixes de fibrilas longas e parcialmente recobertas por mineralização (D, H-setas). (A, C, E e G – Aumento 1650x, barra em G= 10 μ m; B, D, F e H – Aumento 6200x, barra em H=2 μ m)

6 DISCUSSÃO

Vários estudos têm se preocupado com o comportamento da dentina esclerosada nos processos de adesão. A grande maioria dirigida à dentina esclerosada cervical ou logo abaixo de processos cariosos. Com o aumento da expectativa de vida, tem surgido um número crescente de indivíduos portadores de dentes com faces oclusais/incisais desgastadas caracterizadas por uma exposição dentinária e consequente esclerose, típicos de indivíduos com mais de 50 anos. Diante desta nova realidade clínica, a Odontologia tem caminhado rumo a mudanças principalmente relacionadas à qualidade do tratamento restaurador. Algumas questões são relevantes quando se trabalha em dentina esclerosada em bordos incisais. Uma delas é a escassez deste tipo de substrato para pesquisas *in vitro*, pois a presença de dentes com estas características na cavidade oral por mais tempo ocorre em função da longevidade da população. Este fato tem levado pesquisadores a procurar substratos alternativos que se assemelhem ao dente humano em pesquisas laboratoriais como é o caso do presente estudo.

Além da maior preservação dos dentes na cavidade oral pelos indivíduos de uma forma geral, outros autores têm comentado sobre a dificuldade legal, exercida pelas comissões de bioética em pesquisa, e a falta de padronização pós extração dos dentes humanos que acabam funcionando como fatores limitantes para o desenvolvimento e a progressão de mais estudos (4,5,53,75). Portanto, justifica-se a necessidade de encontrar substratos alternativos que se aproximem dos substratos humanos em testes *in vitro*. Neste sentido, a escolha do dente bovino se fez devido não só à semelhança macroscópica dos mesmos comparados ao humano, mas também por semelhanças morfológicas comentadas em estudos anteriores (2,20,25,26). Além disso, o uso do dente bovino em pesquisas laboratoriais tem sido aprovado por vários pesquisadores (2,20,23,24,29,59,61).

A comparação entre os dentes humanos e bovinos são diversas, vão desde testes de adesão, ensaios de microinfiltração, análises morfológicas, de radiodensidade, entre outras. Alguns autores aprovam sua utilização, enquanto outros alertam para algumas diferenças (24,28,54,56,60). Como pôde ser observado na literatura revisada, o dente bovino tem sido amplamente utilizado, mas somente

nos últimos anos alguns autores têm dado importância ao uso do dente bovino esclerosado.

Em 2007, Camargo (4) observou que dentes bovinos provenientes de animais com mais de três anos de idade apresentavam faces incisais desgastadas com características macroscópicas de esclerose dentinária e que poderiam ser utilizados em pesquisas laboratoriais pela facilidade de obtenção e padronização dos mesmos.

Para minimizar as dificuldades de padronização em estudos com o uso da dentina esclerosada, alguns autores elaboraram uma escala, como é o caso da Escala de Esclerose Dentinária da Carolina do Norte reportada por Heymann e Bayne (52) a qual tem sido utilizada como referência em outros estudos (42,45). No entanto, de acordo com Marshall et al. (31), a variabilidade entre dentes de um mesmo indivíduo e entre os próprios indivíduos é muito grande. Diante desse fato, quando se trabalha com dentes esclerosados essa variabilidade tende a se agravar (17). Mesmo porque a literatura tem se baseado no que diz respeito às características histológicas da dentina esclerosada humana referindo-se principalmente às lesões cervicais não cariosas e sob lesões de cárie (17,40,41,44,80).

Estes dois tipos de esclerose dentinária não são objeto de nosso estudo e sim àquelas lesões não cariosas geradas por atrição em bordos incisais. São pouquíssimos os estudos que se referem a este tipo de dentina e isso nos impulsionou a desenvolver este estudo comparativo para o melhor entendimento das características da dentina encontrada nessa região incisal. Não sabemos se ela poderia ser similar à dentina esclerosada de outras localidades nem tão pouco se essa similaridade seria válida para dentes bovinos. Acreditamos que pode haver diferenças especialmente por terem etiologias distintas e se tratar de diferentes espécies.

No presente estudo, com o intuito de tornar mínima essa variabilidade, optou-se por selecionar apenas incisivos humanos esclerosados com características macroscópicas parecidas com àquelas encontradas nos dentes bovinos provenientes de animais abatidos com mais de 3 anos de idade relatadas por Camargo et al. (2,3). A padronização da seleção dos dentes foi baseada na comparação de dentes considerados idosos do ponto de vista funcional e dentes jovens sejam eles humanos ou bovinos. Levando-se em consideração a dificuldade

em se obter especialmente incisivos humanos, esclerosados ou não, a amostra foi restringida a um número de cinco espécimes por grupo para cada metodologia.

De acordo com Camargo (4), a validação do substrato esclerosado humano frente ao bovino seria uma alternativa ao desenvolvimento de mais estudos. Já que os incisivos humanos esclerosados, além de serem escassos, também apresenta uma área de adesão bastante restrita, o que dificultaria sua utilização em testes de resistência adesiva.

Para alguns autores as propriedades de dureza e elasticidade têm sido relacionadas com a força de adesão e esta se relaciona com a fase mineral (77) e a matriz colágena (66). É importante notar que dureza e o módulo de elasticidade podem ter papel importante para predizer o comportamento em interfaces dente/restauração (31). Aliado a isso, densidade e diâmetro dos túbulos têm sido investigados por acreditar-se trazer grande impacto em procedimentos restauradores, posto que se relacione com a formação dos tags e da camada híbrida (9,11-13,43).

Concordando com essas observações, ocorreu-nos aprofundar o presente estudo com a utilização das seguintes metodologias: nanodureza e módulo de elasticidade, bem como análise do conteúdo mineral e densidade tubular, aliados ao estudo qualitativo da micromorfologia superficial inorgânica (MEV) e orgânica (MET).

Alguns autores (83,86-89) relataram uma correlação positiva entre o conteúdo mineral e as propriedades de dureza e módulo de elasticidade. Isto nos fez acreditar que a análise do conteúdo mineral poderia nos responder a suposição de que quanto maior o conteúdo mineral maior seria a dureza. No entanto, no presente estudo não foi possível estabelecer este tipo de correlação já que as concentrações de Ca e P foram similares para todos os grupos experimentais. Porém, se algumas características foram similares e outras diferentes, concordamos que as diferenças mecânicas não estariam relacionadas com a concentração de Ca e P propriamente dita, mas sim, com outras características tais como a topografia e arranjo das fibrilas colágenas (86) e a densidade tubular (78).

Com relação às técnicas de indentação, a literatura tem mostrado dois tipos de técnicas: a microindentação e a nanoindentação (também denominada ultra microindentação). Sejam elas na ordem de micrometros ou nanometros, têm sido usadas extensivamente para investigar a dureza de tecidos biológicos (72-74).

Acreditamos, em concordância com outros autores (87), que o método por nanoindentação seja mais preciso que o da microindentação por possuir um alto grau de automação não dependente do operador, além de ser um sistema de medição confiável. Segundo Barbour e Rees (69) trata-se de uma técnica moderna que permite a leitura de áreas nanométricas em profundidades menores que $1\mu\text{m}$ e áreas bem definidas. No presente trabalho, a profundidade média atingida foi de 199nm e a área analisada foi a de dentina intertubular. Além disso, a nanoindentação possui reprodutibilidade técnica, de modo a ser possível a comparação de resultados. No entanto, há divergências na comparação dos resultados, não pelo método propriamente dito, mas sim devido à falta de padronização dos preparos, tipos de substratos, meios de leitura, diferentes regiões, entre outras, o que poderiam prejudicar a interpretação dos resultados (70,75,79). A escolha pela técnica da nanoindentação permitiu adicionalmente a determinação de mais um dado, o módulo de elasticidade (69).

Apesar de já terem sido realizadas inúmeras pesquisas *in vitro* com dentes bovinos, alguns pesquisadores têm alertado o fato da transferência de resultados, sem levar em conta as diferenças existentes entre os dentes bovinos e humanos. Estes resultados devem ser adequados ao tipo de experimento e devidamente extrapolados após a sua correta compensação. Para tanto, saber as diferenças entre estes substratos torna-se imprescindível (20,24).

Em vista disso, é importante entendermos o comportamento dos tecidos saudáveis para então analisarmos o tecido alterado que no nosso caso é o esclerosado. Comparamos primeiramente dentina humana saudável e dentina bovina saudável.

Não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes no conteúdo de Ca (DHS $68.33\pm 0.28\%$ e DBS $68.05\pm 0.20\%$) e de P (DHS $31.66\pm 0.28\%$ e DBS $31.94\pm 0.20\%$), nem tão pouco na relação Ca:P que foi de $2,15\pm 0,05$ para DHS e $2,13\pm 0,04$ para DBS. Resultados confirmados por Gray e Burgess (22) como sendo uma das razões que validam o uso do dente bovino como substituto do humano, e também próximos aos valores relatados para dentina humana, vistos por Arnold e Gaengler (94), em que a relação Ca:P obtida foi de $2,1\pm 0,1$. Outra evidência que corrobora nossos achados foi a similaridade na densidade radiográfica entre dentes humanos e bovinos sugerindo concentrações minerais semelhantes (58,59).

Entretanto, na análise da nanodureza, a dentina humana saudável mostrou-se menor que a bovina (DHS $0,27 \pm 0,15$ GPa e DBS $0,75 \pm 0,20$ GPa). Os valores obtidos foram compatíveis com os de Kinney et al. (79) cuja variação foi de $0,51 \pm 0,02$ GPa a $0,15 \pm 0,03$ GPa para dentina intertubular em diferentes profundidades.

O fato de que a dentina bovina também é composta por colágeno do tipo I, outra razão que favorece sua utilização em estudos *in vitro*, instou-nos a analisar seu conteúdo orgânico em MET. Uma trama mais compactada, com fibrilas dispostas desorganizadamente foi encontrada na DBS (Figura 5.3EF, pág.65), enquanto que na DHS (Figura 5.3AB, pág.65) notou-se uma periodicidade maior como relatada por El Feninat. (46). Isso levou-nos a crer que essa compactação dada pelo maior embricamento das fibrilas na DBS possa ter sido responsável pela alteração não só dos valores de nanodureza, mas também os de módulo de elasticidade.

De acordo com alguns autores (66-68), o comportamento elástico dos substratos está relacionado com o relativo volume do conteúdo mineral e de colágeno. Os resultados do presente estudo revelaram que a DBS apresentou maior módulo de elasticidade que a humana (DHS $9,39 \pm 5,69$ GPa e DBS $23,55 \pm 4,97$ GPa). Ao compararmos a dentina com o esmalte, o módulo de elasticidade da dentina é inferior, isto se deve ao seu maior conteúdo orgânico responsável pela elasticidade e distribuição de estresse (37,61,71). Diante desta informação, o maior módulo de elasticidade obtido pela dentina bovina estaria relacionado ao seu menor conteúdo orgânico em relação à humana. Em outras palavras, parece-nos que as fibrilas colágenas da DBS são mais desorganizadas e com aspecto mais imbricado (Figuras 5.3F, pág.65) que se traduz por uma formação ainda não completa acarretando um conteúdo orgânico menos estruturado. O que reforça esta idéia é a observação de que a dentina bovina tem significativamente menos tempo de formação que a humana. Pois os dentes humanos jovens, provavelmente são oriundos de indivíduos entre 18 a 35 anos enquanto que os dentes bovinos de animais entre 6 meses a 1,5 anos. Entretanto, Sano et al. (61) afirmaram não haver diferenças no módulo de elasticidade entre dentes humanos e bovinos e que o colágeno contribui cerca de 30% na resistência da dentina mineralizada.

A literatura tem reportado valores que vão desde 10,1 GPa até 21,1 GPa, valores compatíveis com os nossos, mas que refletem a dificuldade na padronização

e interpretação dos resultados (79). Porém, ainda existem lacunas sobre a relação das propriedades de dureza e elasticidade com o mineral intra e extrafibrilar da matriz colágena. Há evidências de que o mineral intrafibrilar seja o maior contribuinte na resistência de tecidos mineralizados e que variações no módulo de elasticidade poderiam estar relacionadas com a topografia superficial das fibrilas ou com o conteúdo mineral intra ou extrafibrilar (86,90).

Inúmeros autores têm realizado estudos sobre o número e o diâmetro dos túbulos dentinários, porém poucos são os que compararam diferentes espécies (2,21,24). A área de observação utilizada na contagem dos túbulos foi de 104,34 por 78,26 μm ou 0,0081 mm^2 . Foram encontrados, em média, nessa área $359,40 \pm 66,95$ túbulos em DHS; $291 \pm 58,60$ em DBS; $236,40 \pm 85,65$ em DHE e $152,66 \pm 69,78$ em DBE. Esses dados correspondem a uma densidade tubular (túbulos/ mm^2) de $4,5 \times 10^4$ para DHS; $3,67 \times 10^4$ para DBS; $2,9 \times 10^4$ para DHE e $1,88 \times 10^4$ para DBE.

Schilke et al. (24) não obtiveram diferenças estatisticamente significantes de densidade tubular entre dentes bovinos e humanos, no entanto, seu estudo utilizou molares humanos e não incisivos humanos como exposto no presente estudo. A maioria dos trabalhos compara diferentes regiões (superficiais e profundas), localizações (coroa e raiz) e/ou tipos de dente (permanente e decíduo) (24,36,57). Mesmo assim, encontramos valores que corresponderam aos nossos como os de Carrigan et al. (34) em incisivos centrais humanos com densidade tubular ao redor de $4,4 \times 10^4$ túbulos/ mm^2 , resultado muito próximo ao nosso que foi de $4,5 \times 10^4$ túbulos/ mm^2 . Ou ainda estudos de Tagami et al. (62) com resultados de $3,03 \times 10^4$ túbulos/ mm^2 para incisivos bovinos também próximos ao nosso que foi $3,67 \times 10^4$ túbulos/ mm^2 .

Quanto ao diâmetro dos túbulos, foi realizada uma análise puramente descritiva por meio das eletromicrografias de varredura nas quais indicaram que o diâmetro dos túbulos da DBS (Figura 5.1F, pág.62) foi maior que na DHS (Figura 5.1B, pág.62). Isto corroborou com resultados de Schilke et al. (24) em que o diâmetro dos túbulos da dentina bovina próxima à polpa ($3,50 \pm 0,33 \mu\text{m}$) foram mais largos do que na humana ($2,90 \pm 0,22 \mu\text{m}$), apesar de terem utilizado molares humanos. Nas observações realizadas por Dutra-Corrêa et al. (26) também foram notadas diferenças de diâmetro entre as espécies em diferentes profundidades, na

qual a região mediana foi considerada a mais semelhante comparada a outros estudos.

Vários trabalhos utilizaram a técnica de microdureza para medir a dureza das superfícies dentinárias. Em trabalhos anteriores (64), a microdureza da DHS foi maior que a da DBS. Como as medições são de grandezas distintas, cabe salientar que o resultado desse estudo, por sua vez, refere-se às medições realizadas com microindentadores, os quais geram valores que abrangem a estrutura dentinária de forma generalizada (dentinhas peri, inter e intratubular) e não caberia compará-los aos dados de nanodureza obtidos pelo presente estudo, posto que as nanoindentações foram realizadas em dentina intertubular. Deste modo, análises como a densidade tubular e a distribuição entre as dentinas inter e peritubular é que nos deram parâmetros para o entendimento destes resultados.

Alguns autores têm relacionado a densidade tubular com propriedades de dureza dos tecidos dentinários (76,78). No presente estudo, não foi possível estabelecer correlação entre a densidade tubular e nanodureza da DHS e DBS. Concordamos com Kinney et al. (79) que atribuíram a dureza a mudanças nas propriedades da própria dentina. Para esses autores (79), a dureza da dentina peritubular é cerca de 4 vezes maior que a da dentina intertubular. Dados confirmados por Hirayama (95), em que as concentrações de Ca e P foram maiores em dentina peritubular comparada à intertubular, portanto, a presença de dentina peritubular seria determinante para a elevação dos valores de microdureza. Isto foi demonstrado por nosso estudo em MEV, onde a dentina peritubular do grupo DHS (Figura 5.1B, pág.62) formou um arco ao redor do túbulo com maior espessura e definição o que não foi possível encontrar na DBS (Figura 5.1F, pág.62). Em estudo anterior, Castanho et al. (64) demonstraram que a microdureza da dentina humana foi maior que a bovina, provavelmente pela maior quantidade de dentina peritubular.

Estudos que avaliaram a espessura de dentina peritubular bovina em diferentes profundidades (20), descreveram que as diferenças entre dentes bovinos e humanos saudáveis podem ser resultantes de modificações estruturais ou divergências nos mecanismos da formação de dentina e no processo de deposição mineral no interior dos túbulos dentinários para a formação de dentina peritubular.

Em procedimentos adesivos, vários autores são favoráveis à substituição da dentina humana pela bovina relatando resultados favoráveis (23,24,29,55). Como

visto, as diferenças encontradas poderiam interferir no processo de hibridização bem como prejudicar a resistência de união como visto por outros autores (19,20,30). Por isso, concordamos que a substituição do substrato humano pelo bovino deve ser criteriosa e, acima de tudo, o conhecimento detalhado sobre estas diferenças pode melhor conduzir os experimentos *in vitro* de modo a compensar as possíveis variáveis.

A busca destes critérios levou-nos a tentar desvendar as semelhanças e diferenças entre os tecidos dentinários saudáveis: inicialmente humano e bovino. Para então, discutir as diferenças entre saudáveis e esclerosados, ambos humanos.

O processo de esclerose nos bordos incisais acontece basicamente por resposta fisiológica de defesa do organismo frente a atrição e erosão gerada, ainda que de acordo com Stanley (38), a atrição seria a maior responsável pela formação de dentina reparativa, enquanto que a dentina esclerosada, além de ter sua formação frente à atrição, também estaria relacionada com a idade (8,38).

A formação de dentina reparativa pode ocorrer juntamente à esclerosada, uma não impede o desenvolvimento da outra, entretanto, quando há formação de dentina esclerosada fisiológica, a prevalência de dentina reparativa pode ser reduzida (38). No estudo de bordos incisais, como em nosso caso, acreditamos que aconteça justamente isso, há uma mistura de dentina reparativa associada à esclerosada que culmina no aspecto macroscópico de coloração amarelo-acastanhada, categoria 4 na escala de esclerose da Carolina do Norte, descrita por Heymann e Bayne (52), podendo ter predomínio da segunda sobre a primeira.

Resumidamente, a literatura tem estabelecido que a dentina esclerosada possui túbulos ocluídos por material calcificado e que esta oclusão tende a aumentar com a idade (8,10,48). Isto foi confirmado em nosso estudo, onde as dentinas esclerosadas - humana e bovina - mostraram obliteração tubular visualizadas pelas eletromicrografias de varredura (Figura 5.1CG, pág.63). No entanto, não há um consenso em como esta deposição acontece. Alguns autores acreditam que essa deposição seja por aposição de dentina peritubular ou por precipitação de sais de Ca no interior dos túbulos (38). Outros concordam e acrescentam que há mineralização de estruturas orgânicas presentes no lúmen (7) e que o maior conteúdo mineral encontrado na dentina esclerosada poderia estar associado à obliteração tubular (18). Para Marshall et al. (84), mudanças estruturais no lúmen

dos túbulos provocados pela deposição mineral poderiam acarretar alterações na formação da dentina intertubular esclerosada. O que observamos na DHE (Figura 5.1CD, pág.63) foi um aumento da espessura de dentina peritubular com alguns depósitos de calcificação intratubular contribuindo para a obliteração dos túbulos e diminuição do diâmetro da luz dos túbulos em relação à DHS (Figura 5.1AB, pág.63), o que corroborou com as descrições anteriores. Além disso, a dentina peritubular da DHE pareceu mais espessa, mais nítida e com halo mais bem definido. Na DHS também houve presença de dentina peritubular, no entanto, menos evidente. Essas diferenças entre dentina peri e intertubular concordam com o fato de haver mudanças dimensionais na fase mineral segundo Kinney et al. (35).

Em nosso estudo, o número de túbulos na DHS foi maior comparado à DHE. (DHS $4,5 \times 10^4$ e DHE $2,9 \times 10^4$ túbulos/mm²). Ora, se a dentina saudável não sofreu nenhum tipo de injúria e não houve tempo para o processo de esclerose, é largamente sabido que a dentina saudável possua maior densidade tubular. Aliada a essa informação, têm-se que o número de túbulos na dentina humana, segundo Carrigan et al. (34), diminui com a idade. Encontramos uma redução do número de túbulos em torno de 35% da DHS para a DHE corroborando com outros estudos (2) que relataram uma redução em torno de 25%.

Como já descrito anteriormente, a nanodureza foi medida em dentina intertubular. Portanto, o conteúdo mineral intratubular e a composição da dentina peritubular não interferiram nas medidas de nanoindentação. Esta área foi eleita, pois de acordo com Kinney et al.(66), a dentina intertubular é a estrutura de maior peso nas propriedades mecânicas de dureza da dentina como um todo. E Balooch et al. (86) acrescentou que características como a disposição e o arranjo das fibrilas colágenas presentes na dentina intertubular sejam ainda mais importantes na determinação destas propriedades.

Levando-se em conta, que a oclusão tubular proporcionaria uma quantidade maior de depósito mineral, relatada por Mixson et al. (51), era de se esperar que a DHE tivesse concentração mineral de Ca e P maior, e consequentemente valores de nanodureza também maiores que a DHS. O que encontramos foi uma relação Ca:P (DHS $2,15 \pm 0,05$ e DHE $2,13 \pm 0,05$) e nanodureza (DHS $0,27 \pm 0,15$ GPa e DHE $0,31 \pm 0,07$ GPa) similares entre estes grupos. Foi importante notar que mesmo havendo obliteração tubular com a presença de deposição mineral, isso não

ocasionou mudanças nas propriedades mecânicas da porção intertubular de dentina. Observação já descrita por alguns autores que avaliaram dentina transparente abaixo de lesões cariosas e lesões não cariosas cervicais (14,85,92,93). E mais, Marshall et al. (14) afirmaram que a dentina intertubular associada com a transparência não aumentou a nanodureza nem o módulo de elasticidade e que por isso não deveria ser nomeada hipermineralizada ou esclerosada.

A avaliação descritiva do conteúdo orgânico (Figura 5.3ABCD, pág.65) trouxe informações importantes para entender as similaridades obtidas especialmente no que diz respeito ao módulo de elasticidade entre as dentinas humanas saudável e esclerosada (DHS $9,39 \pm 5,69$ GPa e DHE $11,71 \pm 3,42$ GPa). Tanto na dentina humana saudável como na esclerosada, notou-se a presença de fibras longas e mais organizadas dispostas em feixes como indicadas pelas setas na figura 5.3ABCD, pág.65. E também um arranjo menos compactado em ambas as estruturas com pequenos focos de mineralização na DHE notados pelos tons de cinza escuro (Figura 5.3CD, pág.65). Entretanto, nossos achados não compactuaram com os de Suppa et al. (47), que relataram uma redução na distribuição de fibrilas colágenas intactas e proteoglicanas na dentina esclerosada sob lesões cariosas em relação à normal. Tay e Pashley (16) que, ao detalhar o aspecto estrutural da dentina esclerosada humana, observaram a presença de desnaturação da matriz colágena no substrato esclerosado, devido à produção de ácidos e enzimas, produtos da colonização bacteriana em lesões não cariosas cervicais. Já para Zheng et al. (15), o módulo de elasticidade na camada transparente de lesões de cárie ativa foi menor que em lesões estacionadas. Cumpre ressaltar, que nenhum dos autores utilizou dentina esclerosada em bordos incisais.

Tendo ciência das diferenças entre o saudável e o esclerosado, partiremos para a comparação entre os esclerosados: humano e bovino. As primeiras observações em favor do substrato bovino com características de esclerose em bordos incisais em substituição ao mesmo tecido humano foram as similaridades micromorfológicas entre eles, especialmente àquelas relacionadas à obliteração tubular (2,7,16,49).

Assim como em trabalhos anteriores de Camargo et al. (2) e Camargo (4), também constatamos a presença de obliteração tubular em ambos os substratos. No entanto, quanto à contagem de túbulos abertos por área houve diferenças. As

diferenças já haviam sido notadas entre as dentinas saudáveis e permaneceram quando a comparação foi realizada entre as esclerosadas. Ou melhor, a DHE teve densidade tubular maior que a DBE confirmadas pela contagem dos túbulos (DHE $2,9 \times 10^4$ e DBE $1,88 \times 10^4$ e túbulos/mm²) e ilustradas por meio das eletromicrografias de varredura (Figura 5.1CG, pág.62).

Alguns fatores poderiam esclarecer essas diferenças. Em primeiro lugar, poderiam estar relacionadas com o preparo dos espécimes. No presente estudo, com o intuito de minimizar erros e adequar os espécimes para as metodologias aplicadas, foi realizado um polimento superficial com granulações menores ou iguais a 1µm para alisamento superficial e remoção de rebarbas de esmalte dos espécimes esclerosados. Isso não ocorreu no trabalho anterior em os espécimes não receberam nenhum tipo de tratamento para a contagem dos túbulos. O polimento, portanto, pode ter ocasionado remoção superficial de algumas obliterações deixando-os ligeiramente abertos e aumentando a quantidade de túbulos visualizados em MEV. Pois, na comparação entre as densidades de um estudo e outro, notou-se um aumento na quantidade de túbulos/mm², onde as DHE e DBE, respectivamente tiveram uma média de 2,90 e $1,88 \times 10^4$ túbulos/mm² contra 1,39 e $1,32 \times 10^4$ túbulos/mm² sendo o primeiro resultado nosso e o segundo de Camargo et al. (2).

De acordo com outros estudos que tratam do mesmo assunto (24,34,36), essa variabilidade é grande e ocorre frequentemente, pois se tratam da própria variabilidade da espécie, tipo de dente ou região examinada. Outro fator que poderia eventualmente estar associado foi o tamanho da amostra que no caso do nosso estudo foi de 15 por grupo contra 9 do outro trabalho e a área de contagem que em nosso estudo também foi maior $8.165,64 \mu\text{m}^2$ contra $2.294,85 \mu\text{m}^2$ (2).

Todavia, as observações em MEV mostraram algumas particularidades onde se pôde observar que a oclusão tubular na DHE foi evidenciada por um maior acúmulo de dentina peritubular, a qual se mostrou muito mais evidente do que àquela encontrada na DBE (Figuras 5.2AC, pág.63). A presença de um halo em formato circular ao redor dos túbulos visualizados na DHE mostrou um aspecto distinto da DBE, a qual exibiu uma obliteração por recobrimento da própria dentina intertubular gerando um aspecto semelhante com a formação de um esfregaço, pois pareceu não existir formação de dentina peri e intratubular. O aspecto superficial da

DBE pareceu mais plano e liso em relação à DHE concordando com a descrição realizada por Camargo (4). Quanto à luz dos túbulos, notou-se maior diâmetro na bovina esclerosada, provavelmente pela falta de dentina intratubular.

Essas particularidades relatadas poderiam estar intrinsecamente relacionadas às alterações na formação deste tecido. Sabe-se que há diferenças no processo de esclerose quando relacionamos o tempo e o hábito. Quanto ao tempo, o processo de esclerose da DBE é significativamente menor, pois acontece por volta de 3 anos (4); enquanto que para a espécie humana este período sobe para 50 anos ou mais (38). E em relação ao hábito, o processo de desgaste nos dentes bovinos é mais intenso por serem ruminantes. Em vista disso, poderíamos supor que essas diferenças estariam relacionadas à intensidade e duração do estímulo conforme relatadas por Arana-Chavez e Massa (33). E isto pôde ser observado pelas diferenças ligadas à formação de dentina peritubular entre a DHE e a DBE onde foi notada maior quantidade e espessura de dentina peri e intratubular na humana em relação à bovina (Figura 5.2BD, pág.63).

De acordo com Hojo (50), os hábitos alimentares podem influenciar o desgaste de superfícies oclusais. O boi sendo um ruminante, hábitos alimentares e aparelho digestivo, bem como as condições do meio bucal é diferente da espécie humana. Portanto, diferentes texturas e granulações, diferentes níveis de acidez, além do uso de dentifrícios, podem de alguma forma agir sobre as superfícies dentais humanas (4). Por outro lado, os bovinos mastigam muito mais tempo comparados aos humanos, executando movimentos mais favoráveis à atrição que vão desgastando a própria dentina esclerosada que vai se formando (5). Também existe o processo de regurgitação, pelo qual, os dentes bovinos passam mais tempo em contato com substância ácidas provenientes do suco gástrico que fazem com que a superfície fique mais susceptível ao desgaste e menos resistente (65). De fato, Wongkhantee et al. (81) relataram que substâncias ácidas em contato com superfícies dentinárias promoveram um decréscimo na resistência à indentação. A acidez poderia modificar a estrutura da dentina intertubular e alterar os resultados de nanodureza. Contudo, a quantidade de dentina peritubular também deveria ser levada em conta na determinação dos valores de dureza. Sendo assim, a maior microdureza da dentina humana esclerosada em relação à bovina esclerosada

encontradas por outros autores (63,64) pode estar associada à maior quantidade e espessura de dentina peritubular (mais mineralizada).

Embora alguns autores tenham relatado que a dentina esclerosada obteve maior microdureza comparada à saudável (80,82), fica claro que as diferenças de microdureza encontradas em estudos prévios dificilmente poderiam ser comparadas às de nanodureza. Na literatura não há dados sobre a nanodureza e módulo de elasticidade de dentina humana e bovina esclerosada para que possamos comparar os resultados de nosso estudo. Procuramos associar as medidas de nanodureza e módulo de elasticidade do presente estudo ao conteúdo orgânico.

As similaridades morfológicas indicaram a presença de fibras mais longas e mais organizadas em ambos os substratos esclerosados (Figura 5.3CDGH, pág.65). Segundo Marchetti et al. (32), dentes que receberam tratamento com enzimas digestivas removeram apenas matriz orgânica não colagenosa sem modificar a organização do componente colagenoso. Com base nessa informação, acreditamos que a ação ácida sofrida pela dentina bovina esclerosada não tenha alterado as características da dentina intertubular nesta espécie.

Diversos autores têm utilizado a dentina esclerosada em testes de adesão. Por se tratar de um tecido pouco permeável em decorrência da própria obliteração tubular tem mostrado resultados inferiores de adesão (16,39,84). De acordo com Marshall et al.(84), a dentina esclerosada possui alterações químicas o que a torna mais resistente a desmineralização, além de apresentar comportamento adesivo inferior ao da dentina hígida em técnicas adesivas convencionais, necessitando de tratamentos adicionais que demandam pesquisas. Portanto, um aspecto importante a ser considerado em procedimentos adesivos é a quantidade de dentina sólida disponível para a hibridização. Apesar de termos encontrado diferenças na densidade tubular entre humano e bovino esclerosado, em recentes investigações, Castanho et al. (63) constataram que a quantidade de dentina sólida disponível para a hibridização entre a DHE e a DBE foram similares. Para Camargo et al. (3) e Camargo (4), o aumento da área de dentina intertubular disponível para adesão elevou os valores de resistência adesiva quando foi utilizado um procedimento adicional como o polimento superficial com taça de borracha associada à pasta diamantada. Diante disso, foi possível confirmar que alguns tratamentos podem ser

eficazes em procedimentos adesivos e que quanto maior for a similaridade entre a DHE e a DBE melhor será a condução de estudos *in vitro*.

Tendo conhecimento de que resultados de estudos *in vitro* não devam ser extrapolados para condições *in vivo* e ciência de que resultados obtidos em tecidos animais devam ser analisados com reservas, as similaridades encontradas no presente estudo e em estudos recentes são indícios de que a DBE deve ser considerada em estudos *in vitro* que queiram utilizá-la como alternativa.

Uma vez que existem similaridades e diferenças entre as dentinas humanas: saudável e esclerosada é de se supor que elas também existam entre as bovinas: saudável e esclerosada. No presente estudo, constatamos que os valores de nanodureza da DBS foram maiores que os da DBE (DBS $0,75 \pm 0,20$ GPa e DBE $0,43 \pm 0,15$ GPa). Tratando-se da dentina intertubular, local onde foi realizada a nanoindentação, poderíamos supor que a dentina esclerosada bovina tivesse menor dureza por estar em contato com meio ácido proveniente do processo digestivo da espécie como explicado anteriormente. No entanto, acreditamos que o grande responsável pela elevação da dureza na dentina bovina saudável tenha sido o conteúdo orgânico que demonstrou uma disposição mais compactada e desorganizada das fibras colágenas em relação à DBE (Figura 5.3EFGH, pág.65).

Já os valores do módulo de elasticidade foram similares entre a DBS e a DBE (DBS $23,55 \pm 4,97$ GPa e DBE $16,43 \pm 4,87$ GPa) assim como ocorreu entre as dentinas humanas saudáveis e esclerosadas. Pareceu-nos que a maior compactação das fibras na bovina saudável não foi capaz de se diferenciar da esclerosada devido à presença de focos de mineralização encontrados na DBE (Figura 5.3FH, pág.65). Pois, de acordo com Balloch et al. (86), a quantidade de mineral intrafibrilar pode alterar as propriedades elásticas de tecidos mineralizados.

Quanto à densidade tubular, resultados semelhantes aos da humana foram encontrados. A quantidade de túbulos da dentina bovina saudável foi maior que a esclerosada (DBS $3,67 \times 10^4$ túbulos/mm² e DBE $1,88 \times 10^4$ túbulos/mm²), fato ocasionado pela obliteração tubular muito bem descrita na literatura e que foi visualizada pelo presente estudo por meio das eletromicrografias de varredura (Figura 5.1EG, pág.62). Observou-se nítida obliteração tubular e o material de deposição intratubular na DBE foi semelhante a uma camada de esfregaço. O

diâmetro dos túbulos mostrou-se semelhante não sendo possível visualizar diferenças como as vistas entre DHS e DHE (Figura 5.1FH, pág.62).

Análises como as realizadas no presente estudo ainda são escassas. Contudo, acreditamos que a dentina bovina esclerosada poderá vir a ser um substituto confiável para a realização de testes *in vitro*. Alguns trabalhos foram conduzidos utilizando este substrato (2,3,64). Somos convictos de que nossa contribuição deu mais um passo para no futuro estabelecermos parâmetros confiáveis para a sua utilização.

7 CONCLUSÕES

De acordo com a metodologia empregada, pôde-se concluir que:

- a. A nanodureza da dentina bovina saudável foi estatisticamente maior comparada à dentina bovina esclerosada e a humana saudável. A nanodureza da dentina humana esclerosada foi similar estatisticamente a humana saudável e bovina esclerosada. O módulo de elasticidade da dentina bovina saudável foi maior estatisticamente que a humana saudável.
- b. Não houve diferenças estatisticamente significantes no conteúdo de Ca e P entre todas as dentinas estudadas.
- c. A densidade tubular das dentinas saudáveis foi maior estatisticamente que as esclerosadas. A dentina humana saudável e esclerosada apresentou densidade maior estatisticamente que a bovina saudável e esclerosada respectivamente.
- d. Em todas as metodologias empregadas, as dentinas que apresentaram maior similaridade foram as dentinas bovina e humana esclerosadas.

REFERÊNCIAS¹

1. IBGE. Projeção da População do Brasil [citado 27 nov. 2008] Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_impressao.php?id_noticia=1272>.
2. Camargo MA, Marques MM, de Cara AA. Morphological analysis of human and bovine dentine by scanning electron microscope investigation. Arch Oral Biol. 2008 Feb;53(2):105-8.
3. Camargo MA, Roda MI, Marques MM, de Cara AA. Micro-tensile bond strength to bovine sclerotic dentine: influence of surface treatment. J Dent. 2008 Nov;36(11):922-27.
4. Camargo MA. Avaliação da influência do tratamento dentinário na adesão de um sistema etch and rinse à dentina esclerosada bovina, após análise morfológica comparativa à dentina esclerosada humana [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia de São Paulo; 2007.
5. Cara A. Estudo morfológico e mecânico comparativo entre dentina esclerosada humana e bovina [tese de livre-docência]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia de São Paulo; 2009.
6. Nanci A. Ten Cate's oral histology: development, structure, and function. 6. ed. St Louis: Mosby; 2003.
7. Giachetti L, Ercolani E, Bambi C, Landi D. [Sclerotic dentin: aetio-pathogenetic hypotheses]. Minerva Stomatol. 2002 Aug;51(7-8):285-92.
8. Vasiliadis L, Darling AI, Levers BG. The histology of sclerotic human root dentine. Arch Oral Biol. 1983;28(8):693-700.
9. Kwong SM, Cheung GSP, Kei LH, Itthagarun A, Smales RJ, Tay FR, et al. Micro-tensile bond strengths to sclerotic dentin using a self-etching and a total-etching technique. Dent Mater. 2002 Jul;18(5):359-69.
10. Vasiliadis L, Darling AI, Levers BG. The amount and distribution of sclerotic

¹ De acordo com Estilo Vancouver.

human root dentine. *Arch Oral Biol.* 1983;28(7):645-49.

11. Van Meerbeek B, Braem M, Lambrechts P, Vanherle G. Morphological characterization of the interface between resin and sclerotic dentine. *J Dent.* 1994 Jun;22(3):141-46.

12. Harnirattisai C, Inokoshi S, Shimada Y, Hosoda H. Adhesive interface between resin and etched dentin of cervical erosion/abrasion lesions. *Oper Dent.* 1993 Aug;18(4):138-43.

13. Nakajima M, Sano H, Burrow MF, Tagami J, Yoshiyama M, Ebisu S, et al. Tensile bond strength and SEM evaluation of caries-affected dentin using dentin adhesives. *J Dent Res.* 1995 Oct;74(10):1679-88.

14. Marshall GW, Habelitz S, Gallagher R, Balooch M, Balooch G, Marshall SJ. Nanomechanical properties of hydrated carious human dentin. *J Dent Res.* 2001 Aug;80(8):1768-71.

15. Zheng L, Nakajima M, Higashi T, Foxton RM, Tagami J. Hardness and Young's modulus of transparent dentin associated with aging and carious disease. *Dent Mater J.* 2005 Dec;24(4):648-53.

16. Tay FR, Pashley DH. Resin bonding to cervical sclerotic dentin: a review. *J Dent.* 2004 Mar;32(3):173-96.

17. Wood I, Jawad Z, Paisley C, Brunton P. Non-carious cervical tooth surface loss: a literature review. *J Dent.* 2008 Oct;36(10):759-66.

18. Kinney JH, Nalla RK, Pople JA, Breunig TM, Ritchie RO. Age-related transparent root dentin: mineral concentration, crystallite size, and mechanical properties. *Biomaterials.* 2005 Jun;26(16):3363-76.

19. Retief DH, Mandras RS, Russell CM, Denys FR. Extracted human versus bovine teeth in laboratory studies. *Am J Dent.* 1990 Dec;3(6):253-58.

20. Dutra-Correa M, Anauate-Netto C, Arana-Chavez VE. Density and diameter of dentinal tubules in etched and non-etched bovine dentine examined by scanning electron microscopy. *Arch Oral Biol.* 2007 Sep;52(9):850-55.

21. Forssell-Ahlberg K, Brännström M, Edwall L. The diameter and number of dentinal tubules in rat, cat, dog and monkey. A comparative scanning electron microscopic study. *Acta Odontol Scand.* 1975;33(5):243-50.
22. Gray SE, Burgess JO. An in vivo and in vitro comparison of two dentin bonding agents. *Dent Mater.* 1991 Jul;7(3):161-65.
23. Phrukkanon S, Burrow MF, Hartley PG, Tyas MJ. The influence of the modification of etched bovine dentin on bond strengths. *Dent Mater.* 2000 Jul;16(4):255-65.
24. Schilke R, Lisson JA, Bauss O, Geurtsen W. Comparison of the number and diameter of dentinal tubules in human and bovine dentine by scanning electron microscopic investigation. *Arch Oral Biol.* 2000 May;45(5):355-61.
25. Dutra-Correa M, Anauate Netto C, Youssef M, Carmo A, Kuchinski F. Estudo comparativo ao microscópio de luz da morfologia das dentinas bovina e humana. *Rev ABO Nac.* 2005;13:179-83.
26. Dutra-Correa M, Anauati-Netto C, Youssef M, Carmo A, Kuchinski F. Estudo micromorfológico comparativo entre dentina bovina e humana ao MEV. *RPG.* 2003;10(4):312-6.
27. Rueggeberg FA. Substrate for adhesion testing to tooth structure - review of the literature. *Dent Mater.* 1991 Jan;7(1):2-10.
28. Saunders WP. The shear impact retentive strengths of four dentine bonding agents to human and bovine dentine. *J Dent.* 1988 Oct;16(5):233-38.
29. Nakamichi I, Iwaku M, Fusayama T. Bovine teeth as possible substitutes in the adhesion test. *J Dent Res.* 1983 Oct;62(10):1076-81.
30. Anido AA. Dentina humana e bovina: estudo comparativo da resistência adesiva em três diferentes profundidades – teste de cisalhamento [dissertação] São José dos Campos: Universidade Estadual Paulista UNESP, Faculdade de Odontologia de São José dos Campos; 2001.
31. Marshall GW, Marshall SJ, Kinney JH, Balooch M. The dentin substrate: structure

and properties related to bonding. *J Dent*. 1997 Nov;25(6):441-58.

32. Marchetti C, Piacentini C, Menghini P. Morphometric computerized analysis on the dentinal tubules and the collagen fibers in the dentine of human permanent teeth. *Bull Group Int Rech Sci Stomatol Odontol*. 1992 Dec;35(3-4):125-29.

33. Arana-Chavez VE, Massa LF. Odontoblasts: the cells forming and maintaining dentine. *Int J Biochem Cell Biol*. 2004 Aug;36(8):1367-133.

34. Carrigan PJ, Morse DR, Furst ML, Sinai IH. A scanning electron microscopic evaluation of human dentinal tubules according to age and location. *J Endod*. 1984 Aug;10(8):359-63.

35. Kinney JH, Balooch M, Haupt DL, Marshall SJ, Marshall GW. Mineral distribution and dimensional changes in human dentin during demineralization. *J Dent Res*. 1995 May;74(5):1179-84.

36. Mjör IA, Nordahl I. The density and branching of dentinal tubules in human teeth. *Arch Oral Biol*. 1996 May;41(5):401-12.

37. Craig RG, Peyton FA. Elastic and mechanical properties of human dentin. *J Dent Res*. 1958 Aug;37(4):710-18.

38. Stanley HR, Pereira JC, Spiegel E, Broom C, Schultz M. The detection and prevalence of reactive and physiologic sclerotic dentin, reparative dentin and dead tracts beneath various types of dental lesions according to tooth surface and age. *J Oral Pathol*. 1983 Aug;12(4):257-89.

39. El-din AKN, Miller BH, Griggs JA. Resin bonding to sclerotic, noncarious, cervical lesions. *Quintessence Int*. 2004 Aug;35(7):529-40.

40. Yoshiyama M, Masada J, Uchida A, Ishida H. Scanning electron microscopic characterization of sensitive vs. insensitive human radicular dentin. *J Dent Res*. 1989 Nov;68(11):1498-502.

41. Yoshiyama M, Noiri Y, Ozaki K, Uchida A, Ishikawa Y, Ishida H. Transmission electron microscopic characterization of hypersensitive human radicular dentin. *J Dent Res*. 1990 Jun;69(6):1293-97.

42. Prati C, Chersoni S, Mongiorgi R, Montanari G, Pashley DH. Thickness and morphology of resin-infiltrated dentin layer in young, old, and sclerotic dentin. *Oper Dent*. 1999 Apr;24(2):66-72.
43. Yoshiyama M, Sano H, Ebisu S, Tagami J, Ciucchi B, Carvalho RM, et al. Regional strengths of bonding agents to cervical sclerotic root dentin. *J Dent Res*. 1996 Jun;75(6):1404-13.
44. Tani C, Itoh K, Hisamitsu H, Wakumoto S. Efficacy of dentin bonding to cervical defects. *Dent Mater J*. 2001 Dec;20(4):359-68.
45. Kusunoki M, Itoh K, Hisamitsu H, Wakumoto S. The efficacy of dentine adhesive to sclerotic dentine. *J Dent*. 2002 Mar;30(2-3):91-7.
46. El Feninat F, Ellis TH, Sacher E, Stangel I. A tapping mode AFM study of collapse and denaturation in dentinal collagen. *Dent Mater*. 2001 Jul;17(4):284-88.
47. Suppa P, Ruggeri A, Tay F, Prati C, Biasotto M, Falconi M, et al. Reduced Antigenicity of Type I Collagen and Proteoglycans in Sclerotic Dentin. *J Dent Res*. 2006 Feb 1;85(2):133-37.
48. Brännström M, Garberoglio R. Occlusion of dentinal tubules under superficial attrited dentine. *Swed Dent J*. 1980;4(3):87-91.
49. Yagi T, Suga S. SEM investigations on the human sclerosed dentinal tubules. *Shigaku*. 1990 Aug;78(2):313-37.
50. Hojo T. Scanning electron microscopic quantitative study of changes with age in closing pattern of openings of dentinal tubules on worn occlusal surfaces of Japanese permanent mandibular incisors. *Scanning Microsc*. 1990 Dec;4(4):1049-53.
51. Mixson JM, Spencer P, Moore DL, Chappell RP, Adams S. Surface morphology and chemical characterization of abrasion/erosion lesions. *Am J Dent*. 1995 Feb;8(1):5-9.
52. Heymann HO, Bayne SC. Current concepts in dentin bonding: focusing on dentinal adhesion factors. *J Am Dent Assoc*. 1993 May;124(5):26-36.

53. Van Noort R, Noroozi S, Howard IC, Cardew G. A critique of bond strength measurements. *J Dent*. 1989 Apr;17(2):61-7.
54. Reeves GW, Fitchie JG, Hembree JH, Puckett AD. Microleakage of new dentin bonding systems using human and bovine teeth. *Oper Dent*. 1995 Dec;20(6):230-35.
55. Lopes MB, Sinhoreti MAC, Correr Sobrinho L, Consani S. Comparative study of the dental substrate used in shear bond strength tests. *Pesqui Odontol Bras*. 2003 Jun;17(2):171-75.
56. Anido A. Dentina humana e bovina: estudo da profundidade de desmineralização e da espessura da hibridização empregando-se um sistema adesivo convencional ou autocondicionante: análise em MEV [tese]. São José dos Campos: Universidade Estadual Paulista UNESP, Faculdade de Odontologia de São José dos Campos; 2005.
57. Camargo CHR, Siviero M, Camargo SEA, de Oliveira SHG, Carvalho CAT, Valera MC. Topographical, diametral, and quantitative analysis of dentin tubules in the root canals of human and bovine teeth. *J Endod*. 2007 Apr;33(4):422-26.
58. Fonseca RB, Haiter-Neto F, Carlo HL, Soares CJ, Sinhoreti MAC, Puppini-Rontani RM, et al. Radiodensity and hardness of enamel and dentin of human and bovine teeth, varying bovine teeth age. *Arch Oral Biol*. 2008 Nov;53(11):1023-29.
59. Fonseca RB, Haiter-Neto F, Fernandes-Neto AJ, Barbosa GAS, Soares CJ. Radiodensity of enamel and dentin of human, bovine and swine teeth. *Arch Oral Biol*. 2004 Nov;49(11):919-22.
60. Tanaka JLO, Medici Filho E, Salgado JAP, Salgado MAC, Moraes LCD, Moraes MELD, et al. Comparative analysis of human and bovine teeth: radiographic density. *Braz Oral Res*. 2008 Dec;22(4):346-51.
61. Sano H, Ciucchi B, Matthews WG, Pashley DH. Tensile properties of mineralized and demineralized human and bovine dentin. *J Dent Res*. 1994 Jun;73(6):1205-11.
62. Tagami J, Tao L, Pashley DH, Horner JA. The permeability of dentine from bovine incisors in vitro. *Arch Oral Biol*. 1989;34(10):773-77.

63. Castanho GM, Marques MM, Cara AA. Structural and Mechanical Analysis of Sclerotic Dentin: Human versus Bovine [abstract].[citado 17 Jul 2010]. Available from: F:\IADR_2010\Paper134613.html.
64. Castanho GM, Marques JB, Marques MM, Cara AA. Estudo comparativo in vitro da microdureza de dentina esclerosada e saudável: bovina versus humana [resumo PNd151]. Braz Oral Res. 2009;23(Supl. 1):269.
65. Castanho GM, Marques JB, Camargo MA, Cara AA. Avaliação in vitro da microdureza de dentina bovina normal e esclerosada. RSBO. 2009;6(2):123-28.
66. Kinney JH, Balooch M, Marshall GW, Marshall SJ. A micromechanics model of the elastic properties of human dentine. Arch Oral Biol. 1999 Oct;44(10):813-22.
67. Kinney JH, Balooch M, Marshall SJ, Marshall GW, Weihs TP. Atomic force microscope measurements of the hardness and elasticity of peritubular and intertubular human dentin. J Biomech Eng. 1996 Feb;118(1):133-35.
68. Kinney JH, Marshall SJ, Marshall GW. The mechanical properties of human dentin: a critical review and re-evaluation of the dental literature. Crit Rev Oral Biol Med. 2003;14(1):13-29.
69. Barbour ME, Rees JS. The laboratory assessment of enamel erosion: a review. J Dent. 2004 Nov;32(8):591-602.
70. Habelitz S, Marshall SJ, Marshall GW, Balooch M. Mechanical properties of human dental enamel on the nanometre scale. Arch Oral Biol. 2001 Feb;46(2):173-83.
71. Balooch G, Marshall GW, Marshall SJ, Warren OL, Asif SAS, Balooch M. Evaluation of a new modulus mapping technique to investigate microstructural features of human teeth. J Biomech. 2004 Aug;37(8):1223-32.
72. Collys K, Slop D, Cleymaet R, Coomans D, Michotte Y. Load dependency and reliability of microhardness measurements on acid-etched enamel surfaces. Dent Mater. 1992 Sep;8(5):332-35.
73. Marshall GW, Balooch M, Gallagher RR, Gansky SA, Marshall SJ. Mechanical properties of the dentinoenamel junction: AFM studies of nanohardness, elastic

modulus, and fracture. *J Biomed Mater Res* 2001 Jan;54(1):87-95.

74. Angker L, Swain M. Nanoindentation: Application to dental hard tissue investigations. *J Mater Res*. 2006;21(8):1893-905.

75. Xu HH, Smith DT, Jahanmir S, Romberg E, Kelly JR, Thompson VP, et al. Indentation damage and mechanical properties of human enamel and dentin. *J Dent Res*. 1998 Mar;77(3):472-80.

76. Fuentes V, Toledano M, Osorio R, Carvalho RM. Microhardness of superficial and deep sound human dentin. *J Biomed Mater Res A*. 2003 Sep 15;66(4):850-53.

77. Panighi M, G'Sell C. Effect of the tooth microstructure on the shear bond strength of a dental composite. *J Biomed Mater. Res*. 1993 Aug;27(8):975-81.

78. Pashley D, Okabe A, Parham P. The relationship between dentin microhardness and tubule density. *Endod Dent Traumatol*. 1985 Oct;1(5):176-79.

79. Kinney JH, Balooch M, Marshall SJ, Marshall GW, Weihs TP. Hardness and Young's modulus of human peritubular and intertubular dentine. *Arch Oral Biol*. 1996 Jan;41(1):9-13.

80. Fusayama T, Okuse K, Hosoda H. Relationship between hardness, discoloration, and microbial invasion in carious dentin. *J Dent Res*. 1966 Aug;45(4):1033-46.

81. Wongkhantee S, Patanapiradej V, Maneenut C, Tantbirojn D. Effect of acidic food and drinks on surface hardness of enamel, dentine, and tooth-coloured filling materials. *J Dent*. 2006 Mar;34(3):214-20.

82. Grajower R, Azaz B, Bron-Levi M. Microhardness of sclerotic dentin. *J Dent Res*. 1977 Apr;56(4):446.

83. Tesch W, Eidelman N, Roschger P, Goldenberg F, Klaushofer K, Fratzl P. Graded microstructure and mechanical properties of human crown dentin. *Calcif Tissue Int*. 2001 Sep;69(3):147-57.

84. Marshall GW, Chang YJ, Saeki K, Gansky SA, Marshall SJ. Citric acid etching of cervical sclerotic dentin lesions: an AFM study. *J Biomed Mater Res*. 2000 Mar

5;49(3):338-44.

85. Balooch M, Demos SG, Kinney JH, Marshall GW, Balooch G, Marshall SJ. Local mechanical and optical properties of normal and transparent root dentin. *J Mater Sci Mater Med*. 2001 Jun;12(6):507-14.

86. Balooch M, Habelitz S, Kinney JH, Marshall SJ, Marshall GW. Mechanical properties of mineralized collagen fibrils as influenced by demineralization. *J Struct Biol*. 2008 Jun;162(3):404-10.

87. Mahoney E, Holt A, Swain M, Kilpatrick N. The hardness and modulus of elasticity of primary molar teeth: an ultra-micro-indentation study. *J Dent*. 2000 Nov;28(8):589-94.

88. Angker L, Swain MV, Kilpatrick N. Characterising the micro-mechanical behaviour of the carious dentine of primary teeth using nano-indentation. *J Biomech*. 2005 Jul;38(7):1535-42.

89. Angker L, Nockolds C, Swain MV, Kilpatrick N. Correlating the mechanical properties to the mineral content of carious dentine--a comparative study using an ultra-micro indentation system (UMIS) and SEM-BSE signals. *Arch Oral Biol*. 2004 May;49(5):369-78.

90. Landis WJ, Hodgins KJ, Song MJ, Arena J, Kiyonaga S, Marko M, et al. Mineralization of collagen may occur on fibril surfaces: evidence from conventional and high-voltage electron microscopy and three-dimensional imaging. *J Struct Biol*. 1996 Aug;117(1):24-35.

91. Sánchez-Quevedo MC, Nieto-Albano OH, García JM, Gómez de Ferraris ME, Campos A. Electron probe microanalysis of permanent human enamel and dentine. A methodological and quantitative study. *Histol Histopathol*. 1998 Jan;13(1):109-13.

92. Arnold WH, Konopka S, Kriwalsky MS, Gaengler P. Morphological analysis and chemical content of natural dentin carious lesion zones. *Ann Anat*. 2003 Oct;185(5):419-24.

93. Arnold WH, Konopka S, Gaengler P. Qualitative and quantitative assessment of intratubular dentin formation in human natural carious lesions. *Calcif Tissue Int*. 2001 Nov;69(5):268-73.

94. Arnold WH, Gaengler P. Quantitative analysis of the calcium and phosphorus content of developing and permanent human teeth. *Ann Anat.* 2007;189(2):183-90.
95. Hirayama A. Experimental analytical electron microscopic studies on the quantitative analysis of elemental concentrations in biological thin specimens and its application to dental science. *Shikwa Gakuho.* 1990 Aug;90(8):1019-36.
96. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" Campus Sorocaba. Nanoindentação [citado 10 ago 2010] Disponível em: <http://www.sorocaba.unesp.br/gpm/indentacao.htm>.
97. Oliver W, Pharr G. An improved technique for determining hardness and elastic modulus using load and displacement sensing indentation experiments. *J Mater Res.* 1992;7(6):1564-83.
98. Feist IS, De Micheli G, Carneiro SRS, Eduardo CP, Miyagi S, Marques MM. Adhesion and growth of cultured human gingival fibroblasts on periodontally involved root surfaces treated by Er:YAG laser. *J Periodontol.* 2003 Sep;74(9):1368-75.

APÊNDICE A - Dados originais de profundidade (nm), módulo de elasticidade (GPa) e nanodureza (GPa) obtidos por meio do teste de nanoindentação do grupo DHS

Grupo	Profundidade	Módulo de Elasticidade	Nanodureza
DHS1	262,214	8,323	0,211
	263,885	7,457	0,208
	283,797	6,323	0,180
	294,822	5,287	0,166
	324,161	5,239	0,136
	360,534	6,458	0,110
	376,603	4,969	0,101
	394,863	4,828	0,091
	418,546	4,522	0,081
DHS2	125,910	26,927	0,930
	136,206	20,979	0,790
	153,875	24,086	0,618
	161,315	20,921	0,563
	162,017	18,899	0,558
	166,437	19,690	0,530
	196,177	14,981	0,380
	202,549	15,301	0,356
	203,869	14,283	0,350
DHS3	207,062	7,808	0,337
	231,380	6,759	0,270
	235,909	7,275	0,260
	237,093	6,942	0,257
	249,223	5,831	0,233
	252,979	5,810	0,225
	254,003	6,280	0,223
	262,553	6,072	0,210
	295,156	5,257	0,165
DHS4	192,469	13,538	0,391
	239,643	11,595	0,251
	255,345	9,260	0,221
	256,182	9,957	0,220
	257,415	9,352	0,218
	261,666	8,980	0,210
	267,648	7,481	0,201
	279,001	7,415	0,185
	296,784	7,574	0,163
DHS5	211,274	7,752	0,323
	240,914	6,709	0,248
	243,341	7,282	0,243
	244,129	6,921	0,243
	265,140	5,943	0,205
	276,169	6,010	0,189
	286,117	5,737	0,176
	286,805	4,906	0,174
	306,191	4,476	0,153

APÊNDICE B - Dados originais de profundidade (nm), módulo de elasticidade (GPa) e nanodureza (GPa) obtidos por meio da nanoindentação do grupo DHE

Grupo	Profundidade	Módulo de Elasticidade	Nanodureza
DHE1	175,748	14,842	0,414
	176,266	15,071	0,412
	179,590	14,358	0,398
	188,260	14,136	0,366
	202,563	12,648	0,321
	226,787	9,077	0,260
	235,894	11,126	0,244
	237,237	9,827	0,240
	244,189	9,200	0,228
DHE2	196,352	10,709	0,339
	197,829	11,363	0,335
	201,538	13,407	0,324
	202,820	13,575	0,321
	207,083	9,039	0,307
	210,526	11,045	0,300
	211,532	10,254	0,296
	224,551	9,923	0,266
	230,075	10,808	0,254
DHE3	205,331	9,838	0,349
	251,526	6,304	0,231
	279,005	5,267	0,187
	317,064	5,669	0,145
	341,780	4,339	0,124
DHE4	140,885	18,421	0,612
	141,237	21,988	0,610
	148,976	18,980	0,557
	177,805	13,948	0,406
	183,582	14,244	0,383
	184,903	14,596	0,379
	196,942	14,563	0,339
	222,652	13,055	0,272
	250,537	10,043	0,218
DHE5	170,250	17,100	0,436
	174,031	13,736	0,421
	176,465	16,705	0,410
	177,887	18,935	0,404
	222,099	11,990	0,270
	226,119	11,215	0,263
	227,440	11,046	0,259
	238,676	10,732	0,237
	255,785	8,723	0,209

APÊNDICE C - Dados originais de profundidade (nm), módulo de elasticidade (GPa) e nanodureza (GPa) obtidos por meio da nanoindentação do grupo DBS

Grupo	Profundidade	Módulo de Elasticidade	Nanodureza
DBS1	112,414	31,928	1,170
	116,515	27,704	1,086
	116,964	25,935	1,081
	117,592	28,623	1,069
	118,931	27,277	1,043
	121,249	26,535	1,006
	124,435	23,617	0,953
	128,282	24,106	0,897
	131,513	23,175	0,853
DBS2	131,340	17,335	0,845
	145,463	20,730	0,693
	146,894	24,913	0,680
	151,815	18,542	0,636
	165,058	18,418	0,538
	177,619	16,250	0,464
	179,340	14,550	0,455
	184,798	14,629	0,428
	188,248	14,223	0,412
DBS3	103,194	37,131	1,389
	84,964	39,916	2,038
	110,322	33,223	1,227
	130,072	28,296	0,869
	132,578	21,741	0,834
	133,107	25,603	0,829
	135,801	22,830	0,796
	147,356	21,315	0,675
	152,783	20,420	0,628
	159,251	23,326	0,578
	162,941	20,033	0,551
DBS4	58,838	80,250	3,959
	108,039	36,074	1,260
	125,761	28,114	0,926
	127,240	28,420	0,903
	129,787	31,863	0,868
	146,145	24,987	0,684
	177,781	19,402	0,461
	191,250	14,610	0,397

APÊNDICE C – Continuação...

	143,797	22,283	0,710
	144,809	19,876	0,700
	153,022	19,495	0,625
	156,453	21,029	0,600
DBS5	169,010	19,148	0,511
	169,187	20,615	0,510
	170,920	20,257	0,500
	176,421	16,363	0,468
	176,579	16,991	0,468
	182,705	17,086	0,436

APÊNDICE D - Dados originais de profundidade (nm), módulo de elasticidade (GPa) e nanodureza (GPa) obtidos por meio da nanoindentação do grupo DBE

Grupo	Profundidade	Módulo de Elasticidade	Nanodureza
DBE1	151,753	18,078	0,538
	173,654	13,718	0,424
	176,434	14,310	0,412
	186,878	15,698	0,372
	187,060	14,884	0,371
	190,139	15,724	0,360
	198,878	13,304	0,332
	199,108	12,655	0,331
	202,408	14,374	0,322
DBE2	102,334	28,430	1,363
	103,077	35,213	1,343
	140,992	20,882	0,788
	143,314	24,708	0,767
	159,750	24,374	0,629
	162,177	23,311	0,610
	166,044	20,957	0,584
	171,387	23,582	0,551
	181,358	17,724	0,494
DBE3	108,033	30,756	0,975
	157,226	20,092	0,507
	160,692	23,157	0,489
	161,261	21,196	0,485
	199,603	13,341	0,331
	236,220	12,794	0,243
	279,141	10,377	0,179
	286,026	7,958	0,170
	362,346	10,254	0,109
DBE4	145,733	18,726	0,696
	151,062	21,722	0,651
	154,824	16,365	0,618
	168,250	15,313	0,522
	180,824	14,319	0,452
	181,318	13,190	0,449
	182,298	13,956	0,446
	185,559	13,914	0,428
	217,995	10,631	0,311

APÊNDICE D – Continuação...

	192,051	15,656	0,401
	209,548	14,567	0,336
	211,046	13,529	0,332
	211,969	10,719	0,328
DBE5	224,515	12,463	0,293
	226,249	12,193	0,288
	237,124	9,582	0,262
	264,227	9,973	0,210
	268,809	8,402	0,203

APÊNDICE E - Dados originais do conteúdo de Ca e P (%) e relação Ca:P nas três áreas pré-determinadas para os quatro grupos experimentais

DHS	P	Ca	Ca:P		DHE	P	Ca	Ca:P
1a	30.94	69.06	2.23		1a	32.19	67.81	2.11
1b	31.25	68.75	2.20		1b	32.51	67.49	2.08
1c	30.14	69.86	2.32		1c	32.12	67.88	2.11
2a	31.33	68.67	2.19		2a	32.62	67.38	2.07
2b	31.24	68.76	2.20		2b	32.09	67.91	2.12
2c	32.21	67.79	2.10		2c	32.40	67.60	2.09
3a	32.01	67.99	2.12		3a	32.47	67.53	2.08
3b	31.99	68.01	2.13		3b	32.10	67.90	2.12
3c	32.03	67.97	2.12		3c	32.65	67.35	2.06
4a	31.97	68.03	2.13		4a	31.26	68.74	2.20
4b	32.00	68.00	2.13		4b	31.50	68.50	2.17
4c	31.75	68.25	2.15		4c	31.75	68.25	2.15
5a	32.36	67.64	2.09		5a	31.56	68.44	2.17
5b	32.20	67.80	2.11		5b	30.92	69.08	2.23
5c	31.59	68.41	2.17		5c	31.31	68.69	2.19
DBS	P	Ca	Ca:P		DBE	P	Ca	Ca:P
1a	31.46	68.54	2.18		1a	31.93	68.07	2.13
1b	31.65	68.35	2.16		1b	31.81	68.19	2.14
1c	31.77	68.23	2.15		1c	31.93	68.07	2.13
2a	30.91	69.09	2.24		2a	32.22	67.78	2.10
2b	31.46	68.54	2.18		2b	32.23	67.77	2.10
2c	31.95	68.05	2.13		2c	31.22	68.78	2.20
3a	31.67	68.33	2.16		3a	32.09	67.91	2.12
3b	32.23	67.77	2.10		3b	31.93	68.07	2.13
3c	31.87	68.13	2.14		3c	32.03	67.97	2.12
4a	32.54	67.46	2.07		4a	30.41	69.59	2.29
4b	32.47	67.53	2.08		4b	32.03	67.97	2.12
4c	32.75	67.25	2.05		4c	31.74	68.26	2.15
5a	31.87	68.13	2.14		5a	31.75	68.25	2.15
5b	32.26	67.74	2.10		5b	31.91	68.09	2.13
5c	32.36	67.64	2.09		5c	31.94	68.06	2.13

APÊNDICE F - Dados originais da contagem do número de túbulos e densidade tubular de cada imagem para os quatro grupos experimentais

Grupos	Imagem	Numero de túbulos	Densidade tubular
DHS	1	331	41.375
	2	288	36.000
	3	313	39.125
	4	346	43.250
	5	356	44.500
	6	400	50.000
	7	403	50.375
	8	437	54.625
	9	480	41.500
	10	223	37.875
	11	332	44.875
	12	303	46.625
	13	359	55.875
	14	373	45.076
	15	447	41.375
DHE	1	202	25.250
	2	237	29.625
	3	234	29.250
	4	105	38.875
	5	311	26.250
	6	210	41.000
	7	328	39.375
	8	420	38.375
	9	315	20.875
	10	307	23.875
	11	167	23.875
	12	191	19.625
	13	157	16.125
	14	129	29.125
	15	233	29.048

APÊNDICE F – Continuação...

DBS	1	232	29.000
	2	165	44.250
	3	354	33.125
	4	265	32.000
	5	256	45.875
	6	367	39.375
	7	315	44.500
	8	379	33.125
	9	356	37.750
	10	265	31.625
	11	232	31.750
	12	165	35.250
	13	354	40.000
	14	265	36.740
	15	256	29.000
DBE	1	112	14.000
	2	95	11.875
	3	287	18.625
	4	149	28.750
	5	230	23.500
	6	188	08.125
	7	65	25.875
	8	207	22.000
	9	176	22.000
	10	162	20.250
	11	46	21.125
	12	169	15.875
	13	127	06.875
	14	55	27.750
	15	222	18.817

ANEXO A – Parecer de Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da FOUSP

Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia
Comitê de Ética em Pesquisa

PARECER DE APROVAÇÃO
FR - 219879
Protocolo 198/2008

O grupo de trabalho indicado pelo Comitê de Ética em Pesquisa APROVOU, o protocolo de pesquisa: **"Estudo in vitro das estruturas orgânicas e inorgânicas da dentina esclerosada bovina comparada à dentina esclerosada humana"**, de responsabilidade da Pesquisadora Gisela Muassab Castanho e sob orientação do Prof(a). Dr(a). Antonio Alberto de Cara.

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados a este Comitê relatórios anuais referentes ao andamento da pesquisa e ao término cópia do trabalho em "cd". Qualquer emenda do projeto original deve ser apresentada a este CEP para apreciação, de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas.

São Paulo, 11 de novembro de 2008.

Prof. Dr. João Gualberto de Cerqueira Luz
Coordenador do CEP-FOUSP