UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

MARCELA PAGANI CALABRIA

MICROESTRUTURA DA DENTINA OBSERVADA SOB DIFERENTES
CONDIÇÕES CLÍNICAS EMPREGANDO-SE MICROSCOPIA
ELETRÔNICA E EDS.

BAURU

2011

MARCELA PAGANI CALABRIA

**MICROESTRUTURA DA DENTINA OBSERVADA SOB DIFERENTES
CONDIÇÕES CLÍNICAS EMPREGANDO-SE MICROSCOPIA
ELETRÔNICA E EDS.**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia
de Bauru, da Universidade de São Paulo, como
parte dos requisitos para a obtenção do título de
Doutor em Ciências Odontológicas Aplicadas.

Área de concentração: Dentística.

Orientador: Prof. Dr. José Carlos Pereira

Versão corrigida

BAURU

2011

Calabria, Marcela Pagani

C125m Microestrutura da dentina observada sob diferentes condições clínicas empregando-se microscopia eletrônica e EDS. / Marcela Pagani Calabria, - - Bauru, 2011.

173p.:il. ; 31cm

Tese. (Doutorado) -- Faculdade de Odontologia de Bauru. Universidade de São Paulo.

Orientador: Prof. Dr. José Carlos Pereira

A versão original desta dissertação encontra-se disponível no Serviço de Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Bauru – FOB/USP.

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, por processo fotocopiadores e/ou meios eletrônicos.

Assinatura do autor: _____

Data: _13_/_02_/_2012

Comitê de Ética da FOB-USP: Projeto de Pesquisa aprovado em 24 de fevereiro de 2010.

Nº do Protocolo: 183/2009

Folha de aprovação

DADOS CURRICULARES

MARCELA PAGANI CALABRIA

15 de Novembro de 1980	Nascimento
Filiação	Francesco Michele Calabria Célia Regina Pagani Calabria
1998-2002	Curso de graduação em Odontologia pela Universidade do Sagrado Coração (USC)
13/03/2003 a 11/08/2004	Curso de Especialização em Dentística pela Fundação Bauruense de Estudos Odontológicos da Faculdade de Odontologia de Bauru – USP
2005-2007	Curso de Pós-Graduação em nível de Mestrado na Faculdade de Odontologia de Bauru – USP
2007-2011	Curso de Pós-Graduação em nível de Doutorado na Faculdade de Odontologia de Bauru – USP
Associações	APCD – Associação Paulista dos Cirurgiões- Dentistas SBPqO – Sociedade Brasileira de Pesquisas Odontológicas IADR – International Association for Dental Research

“A mente que se abre a uma ideia, jamais voltará a seu tamanho original.”

Albert Einstein

A Deus,
por ter-me dado vida, através de meus pais,
por ter-me dado sabedoria, perseverança e tranquilidade,
guiando e abençoando todos os meus passos durante esta etapa da minha vida,
“Porque todo aquele que invocar o nome do Senhor será salvo”.

Romanos 10:13

DEDICATÓRIA

“Conseguir resultados em sua vida é mais fácil quando tiver pessoas a apoiá-lo emocionalmente. Há uma diferença entre correr sozinho uma maratona ou correr uma com uma multidão para aplaudi-lo”.

Voe Vitale

Aos meus pais, Francesco e Célia. Por me darem a vida, por sempre terem guiado meus passos e estarem ao meu lado em todas as etapas da minha história. Sem vocês nada disso teria sido possível. Vocês me ensinaram o que é o amor, a amizade, respeito, o certo, o errado, a responsabilidade, e sempre apoiaram todas as minhas decisões, mesmo sendo as mais difíceis e longas de serem alcançadas. Sofreram quando eu sofri e se orgulharam quando eu venci. Saibam que com vocês ao meu lado esse longo caminho percorrido se tornou muito mais fácil. Amo vocês!

Ao meu irmão, Luiz. Por sempre ter sido meu confidente, companheiro, amigo e irmão de todas as horas. Você sempre me amparou, principalmente nos momentos em que me faltou a razão. Devo muito dos meus pensamentos sóbrios a você. “Te” amo! **À minha cunhada, Karin:** você é muito mais que amiga, você é como irmã! Sempre me apoiou. Agora me deu uma das maiores alegrias, a de ser titia! “Te” amo de coração!

Aos meus tios Pereira e Eloisa, meus padrinhos, meus segundos pais! Obrigada pelo amor irrestrito, pela confiança e pelo estímulo. Por sempre estarem presentes em todos os momentos da minha vida. Por me permitirem fazer parte de suas vidas tão intensamente! Vocês estão guardados no meu coração para sempre! Sem vocês, talvez, a minha trajetória seria outra, porque muitos dos meus passos foram dados pela admiração que tenho por vocês. Amo vocês demais!

Ao Bruno, meu noivo! Obrigada por esses 5 anos e meio de amor, carinho, amizade e, principalmente, compreensão. Você sempre esteve ao meu lado, independente do quê, do porquê, do quando e do onde. Você não é somente meu amor, você é o meu companheiro, amigo de todas as horas; é a pessoa que sonha os meus sonhos e que me ajuda a realizá-los. Obrigada por ter- me escolhido para fazer parte da sua vida. “TE” AMO!

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Odontologia de Bauru, na pessoa de seu Diretor Professor Doutor **José Carlos Pereira**, por ter-me recebido para que eu pudesse alcançar meu grande sonho e acreditado, que como aluna dessa Universidade, pudesse representá-la. Orgulho-me de ter feito parte dessa casa a qual sempre procurarei honrar.

À Comissão de Pós-Graduação, na pessoa de seu Presidente Professor Doutor **Paulo César Rodrigues Conti**, pelo suporte oferecido para as apresentações de trabalho em Congressos Nacionais e Internacionais, permitindo que novos horizontes e perspectivas fossem agregados aos meus conhecimentos clínicos e científicos.

À CAPES, pelo apoio financeiro, indispensável para a realização deste e de muitos outros trabalhos ao longo desses 4 anos.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

“Existem duas maneiras de ver a vida; uma é pensar que não existem milagres e a outra é que tudo é um milagre”.

Albert Einstein

Ao meu orientador, Prof. Dr. José Carlos Pereira. Obrigada por nunca ter facilitado tudo para mim, pois com certeza eu não teria adquirido a experiência de hoje, tanto profissional, quanto pessoalmente, ao longo desta jornada. Obrigada por ter sido não somente um orientador, mas um EXEMPLO de profissional; competente, responsável, sábio, pesquisador, humilde, honesto e merecedor de tudo o que conquistou até hoje. Obrigada pela PACIÊNCIA. Sei que muitas foram as perguntas, exigências e os pedidos de atenção, e pequeno foi o tempo. Independente do tempo, tudo o que aprendi e tudo o que me tornei até agora, devo a você, que sempre procurou despertar em mim o senso crítico, a curiosidade e a aspiração para que eu me tornasse uma profissional não somente qualificada, mas digna! Obrigada pela confiança em ter delegado a mim funções que nem eu mesma achava ser competente para comandar e realizar. A você, só tenho a agradecer.

Aos professores do Departamento de Dentística, Dr. José Mondelli, Dra. Maria Fidela de Lima Navarro, Dr. Rafael Francisco Lia Mondelli, Dr. Eduardo Batista Franco, Dra. Maria Teresa Atta, Dra. Linda Wang, Dr. Sérgio Kioshi Ishiquiriama, Dr. Aquira Ishiquiriama, Dr. Carlos Eduardo Francischone e Prof. Dr. José Carlos Pereira: exemplos de professores e pesquisadores dos quais me orgulho! Obrigada pelos conhecimentos compartilhados, pela dedicação, incentivo e colaboração.

Às professoras Linda Wang e Maria Teresa Atta, exemplos de profissionais e mulheres. Quero ser assim quando eu crescer! Minhas AMIGAS, obrigada por terem sempre aberto as portas para mim, independente do momento. Admiro e adoro vocês!

Ao Departamento de Materiais Dentários, em especial ao Professor Paulo Francisconi, que sempre me recebeu muito bem e com muito carinho.

Ao Departamento de Histologia, especialmente a Tânia e a Dani, que sempre me ajudaram orientando no preparo dos espécimes e eliminando minhas dúvidas.

Ao Departamento de Cirurgia, nas pessoas dos professores Sant'Anna e Osni, que permitiram minha estadia durante todas as clínicas de cirurgia para a obtenção dos dentes, futuros espécimes.

Ao CIP – Centro Integrado de Pesquisa, nas pessoas do Prof. Vinícius Carvalho, D. Neusa, Márcia Graeff, Marcelo, Rafa e Renato, sempre receptivos, ajudando-me e disponibilizando todos os aparelhos e instrumentos necessários para que o desenvolvimento de nossas pesquisas se desse de maneira tranquila.

Ao Prof. José Roberto Lauris, pela ajuda com a análise estatística, pela paciência e atenção a mim prestada!

A Graciani e Valéria, pela atenção, disposição e carinho a mim dedicados. Vocês são muito especiais e nunca as esquecerei. Muito obrigada por tudo!

Aos funcionários e ex-funcionários da USP – Maria, Lígia, Beth, Sandrinha, Angela, S. Dito, Alcides, em especial a Natália, a Rita e ao Nelson. O que seria de mim sem vocês! Vocês fazem parte do coração dessa Faculdade e estão, também, dentro do meu coração.

Ao NAP/MEPA da Faculdade de Agronomia Luiz de Queiroz, USP – Piracicaba, na pessoa do Prof. Kitajima e Prof. Francisco e ao Renato, que disponibilizaram o Microscópio Eletrônico de Varredura e que sempre me receberam com tanto carinho e atenção.

À FOP – Faculdade de Odontologia de Piracicaba – na pessoa do Prof. Mário de Goes e Adriano - que permitiram que a parte da pesquisa fosse realizada nessa faculdade. Um especial agradecimento ao Adriano que, com toda a paciência e alegria, me ensinou e ajudou na realização das análises, recebendo-me tão bem nessa casa de ensino.

Ao UBAS – em especial a Érika, ao Mauro, a Ana, a Regina e ao Luiz, pela atenção a mim prestada e por permitirem minha permanência nas clínicas para obtenção dos dentes para a pesquisa.

Aos meus amigos de Mestrado e Doutorado, pela convivência e troca de experiências. Em especial às minhas amigas **Luciana Francisconi, Flávia, Karin, Leslie e Lulu**. Obrigada, meninas, por me acolherem com tanto carinho e permitirem que eu fizesse parte dessa turma tão maravilhosa. Vocês são exemplos de amizade e estão no meu coração! **A Larissa, Carol e Kiki!** O que dizer de pessoas tão alto astrais como vocês? Obrigada pela amizade e pelas boas risadas. **A Lu Mascarenhas!** Esse trabalho também é seu. Nunca

imaginei que uma amizade tão grande pudesse nascer de choros, sofrimentos e angústias. Eu me apoiei em você e você em mim e, assim, vencemos a grande batalha do Mestrado e Doutorado. Adorei conhecê-la. Foi um enorme prazer lutar junto com você para que nossos sonhos se realizassem. “Te” adoro!

Aos amigos que fazem parte da minha vida, Rodrigo e Marcela, Cristiane e Ricardo, Fabiana e Bruno, Suellen e Newman, Nathália, Roberta e Magno, Pamela e Márcio, José Ricardo, Priscila e Danilo, Pri, Angélica e Carlos, Juliana e Rafael, Valéria, Marco e Dani, meu carinho incondicional a vocês. Obrigada pelo apoio, pela compreensão, pela ajuda e por sempre estarem alegrando a minha vida.

Aos meus tios Concetta (muitas saudades) e **Giuseppe, ao tio Aldo e as minhas primas Paola (Rafael e bebê) e Carol (Thiago)** que, mesmo longe, sempre tiveram presença marcante e constante em minha vida. Sempre me apoiaram e torceram por mim. A distância jamais nos separou e jamais nos separará. Amos vocês além do alcance.

Ao tio Quinho – Dr. Frederico Pagani Júnior – meu orgulho, meu exemplo. A você todo meu carinho e consideração.

A minha nova família, Marlene, Danilo e Fer e ao Felipe e Ariane, que tornaram meus obstáculos muito mais fáceis e leves de serem enfrentados. Sempre me apoiaram e me escutaram nos momentos difíceis e, obviamente, estavam mais que presentes nos momentos agradáveis. Amo vocês.

A Rosa e a Rô, pois um pedaço deste trabalho é de vocês. Não imagino “minhas casas” sem as duas. Vocês duas pessoas incríveis, merecem todo o meu carinho, além da minha admiração.

Aos alunos da graduação, que auxiliaram muito na obtenção dos dentes, permitindo que eu avaliasse seus pacientes durante as clínicas, compreendendo a importância da pesquisa e tendo paciência comigo.

Aos pacientes, que acreditaram no meu trabalho, permitindo a doação de dentes para o desenvolvimento desta pesquisa. Sem vocês, isso não teria sido possível.

A todos que me apoiaram de alguma forma e continuam apoiando esta minha jornada, obrigada por fazerem parte da minha vida!

**“Bom mesmo é ir à luta com determinação,
abraçar a vida e viver com paixão,
perder com classe e vencer com ousadia,
porque o mundo pertence a quem se atreve,
e a vida é muito para ser insignificante”.**

Charles Chaplin

RESUMO

A proposta deste trabalho foi analisar qualitativa e semiquantitativamente, em M.E.V. - Técnica Convencional, por Retroespalhamento de Elétrons (BSE) e por Espectroscopia de Dispersão de Raios-X (E.D.S.) - a microestrutura dentinária de dentes em diferentes condições clínicas. Formaram-se 7 grupos, com 5 dentes cada grupo: I- inclusos jovens (IJ); II- hígidos jovens (HJ); III- hígidos adultos (HA); IV- com lesão cariosa oclusal (LCO); V- com lesão cariosa cervical (LCC); VI- com exposição radicular (ER) e VII- com lesão cervical não cariosa (LCNC). Após as extrações, os dentes foram imediatamente fixados em Karnovsky. As porções radiculares e o esmalte coronário foram seccionados, preservando-se o terço cervical dos dentes. Os espécimes dentários foram divididos em duas metades, ambas contendo as superfícies vestibulares quanto as linguais, totalizando 70 espécimes. Cuidado especial foi tomado nos grupos com LCO, LCC e LCNC, garantindo que as lesões fizessem parte de suas duas secções. A análise morfológica foi realizada sobre área de dentina fraturada, em três regiões: próximo à superfície externa, no terço médio e próximo à polpa. Os espécimes foram desidratados em concentração ascendente de etanol e secados em ponto crítico. Metade dos espécimes foi metalizada com ouro, para análise em M.E.V., e a metade homóloga com carbono, para observação em E.D.S. e BSE. Os grupos IJ e HJ não mostraram alterações morfológicas, tanto na lingual quanto na vestibular. As dentinas peritubular e intertubular e os prolongamentos odontoblásticos (POs) estavam evidentes por toda a extensão dentinária, assim como fibrilas de colágeno margeando toda a superfície interna dos túbulos dentinários (TDs), muitas vezes lembrando a lâmina limitans (*LL*). Os grupos LCC e LCO mostraram grande quantidade de cristais e estruturas tubuliformes (ETfs) na dentina abaixo das lesões, além das demais estruturas vistas no grupos anteriores. A face lingual das LCCs mostrou-se ausência de estruturas intratubulares (EITs). O grupo ER não apresentou EITs. Entretanto, nesse mesmo grupo, os TDs próximos à superfície mostraram-se mais atrésicos quando comparados aos grupos IJ e HJ e a *LL* era visível por toda a extensão dentinária. Os grupos HA e LCNC mostraram-se muito semelhantes entre si, com cristais obstruindo parcial ou totalmente os TDs. Próximo à região pulpar, os TDs mostravam cristais ao redor dos POs. O grupo LCNC, particularmente, apresentou ETfs com características distintas dos grupos LCC e LCO, pois estas apresentaram-se nos três terços dentinários em menor quantidade. As imagens em BSE mostraram a DI menos mineralizada que a DP, e cristais e as ETfs com características reflexivas semelhantes à DP, identificando-se como es-

truturas mineralizadas. No grupo LCNC, notou-se POs e as membranas, ambos com certa reflexão, revestindo os TDs, sugerindo um processo de mineralização. A análise estatística, após obtenção dos valores semiquantitativos em E.D.S., mostrou que todos os grupos continham, na dentina e nas EITs, Ca, P, Mg e S, com exceção da dentina peritubular do grupo LCC que não detectou Mg em sua composição. As estruturas que mostraram maior concentração de Mg foram as ETfs do grupo LCNC. Não houve diferença estatística na razão Ca/P entre as dentinas e EITs.

Palavras-chave: Dentina. Permeabilidade dentinária. Dentina secundária. Cárie radicular. Lesão cervical não-cariosa.

ABSTRACT

SEM/BSE and EDS analysis of dentin microstructure and composition.

The purpose of this study was to analyze, qualitatively and semiquantitatively, with SEM, BSE and EDS, the dentin microstructure in teeth with different clinical conditions. The teeth were divided in 7 groups (n=5 each one): I- Young non erupted teeth (YNET), II- Young sound teeth (YST), III- Old sound teeth (OST), IV- Occlusal carious lesion (OCL), V- Cervical carious lesion (CCL), VI- Root exposure (RE) and VII- Non carious cervical lesion (NCCL). After extraction the teeth were immediately fixed in Karnovsky. Crowns and root were cut off in such a way to preserve the cervical third for the purposes of this investigation. The cervical specimens were fractured in two halves, both containing the lingual and buccal cervical surfaces, totaling 70 specimens. Special care was taken with OCL, CCL and NCCL groups during the fracture to ensure that both fragments enclosed part of their respective lesions. The morphological analysis was performed on the fractured dentin surfaces of both fragments, in three regions: near the external surface, on the middle third and near the pulp chamber. The specimens were dehydrated in ascending series of ethanol concentrations and critical point dried. Half of the specimens were gold sputtered for SEM analysis and the homologous half carbon coated for BSE and EDS observation. The YNET and YST groups showed no morphological changes in both buccal and lingual surfaces. The PD and ID and the OPs were evident throughout the dentin extension. The collagen fibrils were observed layering the walls of dentin tubules in their entire length, resembling the *LL*. The CCL and OCL groups showed a great amount of Crs and TSs, together with the other same features seen in the previous groups. The lingual surface of the CCL was distinct from the buccal surface and the OPs were limited to the third near the pulp on both surfaces. The RE group did not reveal intratubular structures (ITS). However, on the same group, the diameter of the dentin tubules near the surface was smaller compared to YNET and YST groups and the *LL* was visible throughout the dentin extension. The OST and NCCL groups were very similar, with Crs partially or totally obstructing the DTs. Near the pulp, the DTs showed Crs around the OPs. The TSs seen in NCCL group were distinct from that of CCL and OCL groups, because these structures were presented in all dentin extension and in a smaller number. The BSE images showed that the intertubular dentin is less mineralized than peritubular dentin. However, TSs and Crs showed the same reflective characteristics of the PD, looking like mineralized structures. In NCCL group, the OPs and the membranes-like structure

surrounding the tubules presented some reflection, suggesting a mineralization process of these structures. Statistical analysis after EDS data showed that dentin surface and TSs of all groups contained Ca, P, Mg and S, except the PD of the CCL group, where the Mg was not detected. The tubular structures presented in the NCCL group showed increasing in Mg concentration. There was no statistical difference in the Ca/P ratio between the dentin and the TSs from all groups.

Keywords: Dentin. Dentin permeability. Secondary dentin. Root caries. Non-carious cervical lesions.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1- Modelo esquemático das características exigidas para a obtenção dos dentes a serem estudados. **A** – Dente hígido jovem ou incluso; **B** – Dente hígido adulto; **C** - Dente com lesão cariiosa oclusal; **D** – Dente com lesão cervical não cariiosa; **E** – Dente com lesão cariiosa cervical; **F** – Dente com exposição radicular 72
- Figura 2- Cortes representativos dos dentes. **A** – Corte dos dentes I, HJ, HA 2-3mm abaixo da JCE e do esmalte oclusal, preservando-se o terço cervical. **B** – Corte dos dentes com LCC, LCNC e ER 2-3mm abaixo da margem cervical da lesão/exposição radicular e das cúspides, removendo-se todo o esmalte oclusal até a exposição da dentina. **C**- Corte dos dentes com LCO 2-3mm abaixo da JCE e removendo o esmalte oclusal, preservando a dentina reacional/esclerótica logo abaixo da lesão cariiosa..... 75
- Figura 3- Fixação do segmento dentário cervical pela base radicular e secção das faces proximais, paralelas uma a outra, para a planificação das superfícies 76
- Figura 4- Remoção do tecido cariado amolecido com colher de dentina em dente com LCO. O mesmo procedimento foi realizado em dentes com LCC 76
- Figura 5- **A** e **B** – Confecção das canaletas nas faces oclusal e radicular com ponta diamantada – espessura de metade do diâmetro da broca, no sentido do longo eixo do dente. **C** – Posicionamento da lâmina confeccionada para direcionar a força de fratura no longo eixo. **D** – Fratura do segmento ao meio, originando dois espécimes correspondentes às faces mesiais e distais, contendo ambas as faces vestibulares e linguais 77
- Figura 6- **A** – Aparelho de ponto crítico utilizado para a secagem dos espécimes. **B** – Gaiolas específicas com furos para secagem em ponto crítico para que o CO₂ líquido penetre nos espécimes, substituindo o etanol a 100%. Espécimes devidamente identificados no interior da gaiola 78
- Figura 7- **A** – Aparelho para a metalização em ouro. **B** – Aspecto dos espécimes após metalização 78
- Figura 8- **A** – Aparelho para deposição de carbono. **B** – Aspecto da superfície dos espécimes após cobertura com carbono 79
-

Figura 9-	Dente dividido em terços: 1- próximo à superfície externa do dente, 2- região mediana da dentina e 3- próximo à polpa, tanto na face vestibular como na lingual	79
Figura 10-	A – Terço superficial da dentina. Notar a grande quantidade de TDs próximos à superfície externa da amostra, assim como o lúmen dos túbulos bastante abertos. Também é possível localizar estruturas fibrilares deslocando-se para fora dos TDs (setas vermelhas), provavelmente, remanescentes de POs (setas vermelhas). B e C – Região média da dentina. Em B é possível notar a grande concentração de fibrilas no interior dos TDs, as quais, assim como em C (setas), se unem para formar uma película que reveste toda a superfície interna da DP, sugestiva de <i>LL</i>	89
Figura 10-	D , E e F – Regiões próximas à polpa. Em D , observam-se os POs deixando a cavidade pulpar e penetrando na pré-dentina. Esta, por sua vez, aparece como uma região fibrilar, ainda desmineralizada, conformando os TDs. Nota-se que não há DP nesta região. Observa-se, ainda, o aumento na quantidade de túbulos por área nessa região e a consequente diminuição da DI. Em E , a fratura transversal expõe a profusão de POs, com um aspecto de “cabelo de anjo”, enquanto que em F , em aumento de 10000X, é possível notar o aspecto fibrilar da membrana celular dos POs (setas pretas), bem diferente do aspecto fibrilar da membrana (seta branca) que reveste a DP.	90
Figura 11-	A – Imagem pela técnica BSE das amostras homólogas aos espécimes analisados em M.E.V. Assim como em M.E.V., é possível notar a ausência de estruturas internamente aos TDs. As imagens mostram claramente a diferença de mineralização entre a DP, mais mineralizada, e a DI, menos mineralizada, através do contraste de brilho.....	90
Figura 12-	A e B – Região próxima à superfície externa da amostra. Notar, nessa região, a reduzida densidade tubular em comparação com as áreas mais profundas da dentina. A figura A mostra, ainda, a presença de um PO que alcança essa região (seta). Em B , em maior aumento, distingue-se claramente a DI da DP, assim como a concentração de fibrilas de colágeno no interior dos TDs (seta).	91
Figura 12-	C e D – Região média da dentina. Em C , notar a presença dos POs no interior de alguns TDs (setas); e em D , uma membrana de aparência fibrilar (<i>LL</i>) se descolando da superfície interna da DP (seta).	92

Figura 12- E e F – Regiões próximas à polpa. Em E , nota-se a elevada densidade tubular. Em um dos TDs destaca-se um PO, com seu aspecto tubular e fibroso (seta preta), assim como a notória constituição fibrilar da parede interna dos TDs (seta branca). Em F , nota-se a região da pré-dentina parcialmente mineralizada, com os POs estendendo-se desde o corpo celular e ocupando os espaços intratubulares.....	93
Figura 13- A – Amostra do grupo HJ observado pela técnica BSE. Nessa figura é possível constatar a ausência de estruturas mineralizadas no interior dos TDs. A DP apresenta-se mais reflexiva e compacta, comparada à DI, com pontos eletrodensos por toda a superfície.....	94
Figura 14- A e B – Região próxima à superfície externa do dente. A – Notar o diâmetro reduzido dos TDs e espessura da DI. B – Em maior aumento, notar a concentração de cristais no lúmen dos TDs. C e D – Região média da dentina – Notar a maior quantidade de cristais no interior dos TDs comparado à superfície externa. Observa-se, em C , que esses cristais circundam o PO (setas). Em D , observa-se aspecto granuloso da DI. E, F, G e H – Regiões próximas à polpa. E – Notar a presença de cristais no interior dos TDs e a DP com espessura bem definida (setas)	96
Figura 14- Em F , observa-se PO circundado por cristais (setas brancas), assim como fibrilas no interior dos túbulos (setas pretas). G – Visão do espaço pulpar tomado pela deposição de dentina terciária. H – Apesar da proximidade com a câmara pulpar, observa-se uma grande quantidade de DI; mesmo com a atresia pulpar, os POs são vistos no interior dos delgados lúmenes dos TDs (setas brancas).	97
Figura 15- A – Notar as variações observadas na DP, desde seu espessamento, quase que obliterando totalmente os TDs, até áreas irregulares e regiões que se confundem com a DI. B – É raro observar o lúmen dos TDs, provavelmente devido à esclerose da dentina	97
Figura 16- A, B, C, D e E – Regiões próximas à lesão cariosa. Notar a presença de cristais internamente aos túbulos dentinários, <i>dentin casts</i> , assim como a obliteração dos túbulos pelo espessamento da DP. Em A (seta preta tracejada), ainda se sugere que as ETfs são a DP deslocada do interior dos TDs.	99

-
- Figura 16- Em **B** e **C** nota-se a aparente independência dessas ETfs, dando um aspecto de descontinuidade à DP. Em **A** e **D** nota-se a superfície granulosa dos *dentin casts*, sugerindo que essas estruturas são formadas a partir da precipitação de cristais (setas pretas). Em **E**, notam-se TDs obliterados parcialmente por cristais romboédricos. **F** – Região média da dentina. Notar os TDs desobstruídos e o ligeiro espessamento da DP dessa região. Poucos remanescentes de POs foram localizados, como mostra a seta. Em **G** – Notar a irregularidade dos TDs próximos à região pulpar, característica de dentina terciária. Não é possível observar DP. Os TDs encontram-se revestidos por uma membrana e contornados basicamente pela DI. 100
- Figura 17- **A** e **B** corroboram os achados morfológicos da dentina na região logo abaixo da lesão cariosa. Notar a presença de cristais e estruturas de formato tubular (*dentin casts* – setas brancas) preenchendo o interior do lúmen dos túbulos. Notar também a característica altamente mineralizada dessas estruturas, notabilizada por reflexão de elétrons igual ou, eventualmente, maior que a DP. Notar, em **A**, áreas da DI praticamente sem áreas de reflexão de elétrons, o que denota um grau de mineralização menor; em **B**, a grande concentração de pontos brilhantes no mesmo tipo de dentina, mostra sua característica altamente mineralizada 102
- Figura 18- **A-E** – Regiões próximas à superfície da lesão cariosa. Em **A**, notar cristais romboédricos, aparentemente entrelaçados por fibrilas, obliterando os TDs parcial ou totalmente. Em **B**, notar os *dentin casts* com aspecto granuloso (seta branca), a DI com aspecto fibrilar e a aparente ausência da DP em algumas regiões (seta preta). Em **C**, em uma vista da superfície escavada da lesão, notar as ETfs extruídas e expostas à superfície da dentina. Em **D**, observa-se outro padrão de obliteração tubular, neste caso pelo espessamento da DP (setas). Observar em **E**, o aspecto oco de um *dentin cast* (seta), assim como a ausência da DP. Os *dentin casts* mostram a superfície com aspecto liso. 104
- Figura 18- **F-H** – Correspondente à região média da dentina. Em **F**, as ETfs mostram-se com característica de uma membrana fragmentada (setas). Em **G**, notar um túbulo quase que totalmente obliterado por cristais. Em **H**, observam-se algumas áreas com obliteração total pelo espessamento da DP, assim como túbulos que estavam parcialmente obliterados (setas). 105
-

-
- Figura 18- **I e J** – Regiões próximas à polpa. Em **I**, nota-se a presença de uma dentina terciária, próxima a região de pré-dentina, a ausência de DP e poucos POs extruídos dos TDs. Em **J**, veem-se muitos POs no interior dos túbulos em uma região de fratura, assim como se nota a ausência da DP nessa região. **K, L e M** – Região próxima à superfície do dente, média da dentina e próxima à polpa da face lingual, respectivamente. Em **K**, os TDs encontram-se praticamente abertos e com poucos cristais no seu interior. Em **L**, notar TDs com fibrilas e uma membrana revestindo sua parede interna (setas). Em **M**, notar a grande concentração de TDs próximos à polpa, preenchidos por POs e com a parede interna revestida pelo que sugere ser a *LL* (setas). Notar, também, a ausência da DP em grande parte dos túbulos. 106
- Figura 19- **A, B e C** – Imagens em BSE das regiões logo abaixo da lesão cáriosa. Notar a presença de uma DI bastante mineralizada. Em **A**, observar a grande quantidade de ETfs logo abaixo da lesão e com aspecto muito mais mineralizado quando comparado às outras estruturas da dentina. Em **B**, perceber a presença de cristais no interior das ETfs, assim como a evidente distinção entre DP e a ETf (seta). Em **C**, ainda, pode-se verificar o aspecto oco de uma ETfs. Em **D** observa-se a dentina na face lingual. Assim como em M.E.V., é possível constatar a ausência de estruturas internamente aos TDs e DI e DP menos mineralizadas quando comparadas à face homóloga vestibular com LCC..... 107
- Figura 20- **A, B, C e D** – Regiões próximas à superfície externa com ER. Em **A**, notar grande quantidade de TDs obliterados devido ao espessamento da DP (setas pretas). Ainda, nessa mesma figura, verificam-se alguns túbulos com seus diâmetros bastante reduzidos (setas brancas), o que pode ser também constatado em **B** (setas) 109
- Figura 20- Em **C**, notar áreas com TDs excepcionalmente abertos, nos quais se observa a arquitetura fibrosa de sua parede interna (setas). A figura **D** representa o único espécime do terço superficial da dentina, neste grupo, que mostrou a presença de pequenos cristais obliterando parcialmente os TDs (setas) 110
- Figura 20- **E e F** – Regiões média da dentina. Notar túbulos amplamente abertos, com membranas revestindo-os internamente, em **E**, e em **F**, notar POs deixando os lúmenes tubulares (setas). **G e H** – Regiões próximas à polpa. Observam-se muitos túbulos e seus POs, especialmente em **H**, na região correspondente ao artefato de técnica 111
-

-
- Figura 20- **I, J, K e L** – correspondem às faces linguais do grupo com ER. **I** – Região próxima à superfície externa do dente. Notar atresia tubular e a presença de uma membrana no interior dos túbulos (setas). **J e K** – Região média da dentina. Em **J**, notar presença de POs no interior dos TDs (setas). Em **K**, notar a grande quantidade de fibrilas no interior dos TDs, assim como muitas delas margeando toda a parede interna da DP. **L** – Região próxima à polpa. Notar aspecto fibrilar dos POs e a grande quantidade de fibrilas nos lúmenes tubulares. 112
- Figura 21- **A e B** – Imagens das amostras vestibulares e linguais, respectivamente, do grupo ER, pela técnica BSE. Assim como em M.E.V. convencional, não se observa nenhum tipo de EIT, sejam cristais ou ETfs. Em ambas as figuras destacam-se, como áreas mais reflexivas, os perfis da DP, devido ao seu maior grau de mineralização. Notar, também, a intensa mineralização da DI..... 113
- Figura 22- Em **A**, notar o formato em cunha da LCNC e, em **B**, o formato em pires. **B, C, D, E** – Região próxima à superfície externa da dentina. Em **B**, é possível observar os TDs alcançando a superfície externa do dente (setas brancas), assim como uma superfície compacta, vítrea e sem túbulos como que recobrimdo a superfície da lesão, em **B e C** (setas pretas). Em **C**, os TDs encontram-se bastante delgados, enquanto em **D**, cristais romboédricos preenchem o interior dos TDs. 115
- Figura 22- Em **E**, notar a presença de estruturas com formato tubular no interior dos TDs, entretanto com aspecto diferente daqueles vistos nos grupos LCO e LCC. Observar o aspecto liso e fragmentando da estrutura tubular. 116
- Figura 22- **F, G, H, I e J** – Região média da dentina. Em **F**, grande quantidade de cristais com formato romboédrico é vista no lúmen dos TDs. **G** mostra o espessamento da DP e consequente obliteração tubular (setas). Em **H**, notar a presença de estruturas com formato tubular (setas pretas). A imagem **I** permite distinguir claramente a diferença entre um PO (seta branca) e uma estrutura com formato tubular, nessa imagem com aspecto liso, (seta preta). Em **J**, veem-se os cristais depositados ao longo da superfície dos POs (setas). 116
- Figura 22- **K, L e M** – Região próxima à polpa. Em **K**, notar resíduos da pré-dentina e o teto da câmara pulpar com aspecto de esponja, abrigando os POs. Em **L**, encontra-se uma estrutura com formato tubular internamente a um TD (seta preta), quando constata a diferença dessa estrutura com a DP. Também, podem-
-

se visualizar túbulos totalmente obliterados pelo aumento da DP (setas brancas). Em M , há cristais entrelaçados às fibrilas dos POs (setas).	117
Figura 22- N , O e P – Face lingual homóloga à LCNC. Verificar em N , região próxima à superfície externa do dente, remanescentes de POs alcançando esse terço dentinário (setas). Em O e P , regiões correspondentes ao terço médio da dentina, vê-se o mesmo padrão das estruturas encontradas na superfície dentinária abaixo das LCNC. Observar em P a presença de uma ETf (seta preta) e de uma estrutura membranosa se descolando do interior dos TDs (seta branca).	118
Figura 23- A e B – Imagens das amostras vestibulares com LCNC e, C – da face lingual homóloga, pela técnica BSE. Assim como em M.E.V., foi possível notar os cristais internamente aos TDs, a DP mais mineralizada, independentemente da face. Ainda, em B , vê-se um adensamento da membrana vista internamente aos túbulos e o seu aspecto fragmentado (setas). Em A e C , os POs, com coloração clara e brilhante, sugerem que ocorreu um processo de mineralização dessas estruturas (setas).	118
Figura 24- Perfil espectral (picos) e composicional (quadro de valores) dos elementos químicos encontrados na DI, mostrando a presença de Ca, P e pequena quantidade de Mg e S. O mesmo foi realizado para a DP, ETfs e cristais.....	120
Figura 25- Mapeamento da figura 24, mostrando a distribuição dos elementos químicos da superfície dentinária. Notar a grande concentração de Mg (azul) e P (amarelo) sobre as ETfs, assim como um ligeiro aumento na concentração de Ca (vermelho), apesar desses elementos serem visualizados por toda a superfície da dentina fraturada	120
Figura 26- Notar uma estrutura com característica membranosa e composição fibrilar se descolando da superfície interna da dentina (DP), denominada no estudo como <i>LL</i>	135
Figura 27- Notar fibrilas margeando a superfície da dentina (setas brancas) claramente distinguível de um filete fibroso e espesso (setas pretas), os POs, próximo à região pulpar. Notar ainda que as fibrilas parecem se conectar com a superfície dos POs – setas pretas.....	136

Figura 28- Dente HA. Observar, mesmo na presença de uma dentina reacional, uma membrana revestindo a parede interna das DPs, com aspecto fibroso (setas).....	138
Figura 29- Exemplo de uma amostra de dentina retirada de uma LCNC com registro de HD. Depois de fraturados e condicionados com ácido fosfórico a 5%, por 15 segundos, ocorreu dissolução da DP. Notar que as ETfs mantiveram-se no interior dos TDs. Notar, também, a presença de cristais no interior de uma ETf - setas (3000X) (CALABRIA et al., 2008).....	142

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Ca-P no sistema biológico em humanos. Adaptado LeGEROS (1991).....	58
Tabela 2-	Agrupamento dos dentes considerando a identificação e as características clínicas	74
Tabela 3-	Aspectos considerados para a análise da micromorfologia dentinária	80
Tabela 4-	Comparação da micromorfologia dentinária entre os grupos estudados e entre as faces vestibulares e suas respectivas faces linguais.....	87
Tabela 5-	Valores médios globais dos elementos químicos em % ($\pm dp$) e razão Ca/P ($\pm dp$), conforme o grupo experimental e suas estruturas.....	121
Tabela 6-	Diferença na concentração elemental (Mg e S) em % entre os grupos e respectivos (dp), para as estruturas DI e DP. Tukey ($p < 0,05$)	122
Tabela 7-	Diferenças entre os grupos na razão Mg/P e S/P e respectivos (dp), para as estruturas DI e DP. Tukey ($p < 0,05$).....	123
Tabela 8-	Diferenças na concentração (%) de Mg e na razão Mg/P nos cristais intratubulares (Tukey, $p < 0,05$).....	124
Tabela 9 –	Diferenças na concentração, em % ($\pm dp$), de Ca e P e na razão Ca/P das estruturas que compõem o grupo LCO (Tukey, $p < 0,05$).....	124
Tabela 10 –	Diferenças na concentração, em % ($\pm dp$), de Ca, P e Mg e nas razões Ca/P e Ca/Mg das estruturas que compõem o grupo LCC (Tukey, $p < 0,05$)	125
Tabela 11 –	Diferenças na concentração, em % ($\pm dp$), de S e na razão S/P das estruturas que compõem o grupo LCNC (Tukey, $p < 0,05$).....	125

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

Å	angstrom
ACP	fosfato de cálcio amorfo
BSE	restroespalhamento de elétrons
β-TCP	beta tricálcio fosfato
β-TCMP	beta tricálcio fosfato magnésio substituto
C	carbono
Ca	cálcio
Cr	cristais
Cl	cloro
CO ₂	gás carbônico
CO ₃ ⁻	carbonato
DCPD	fosfato dicálcio diidratado
DI	dentina intertubular
DP	dentina peritubular
EDS	espectroscopia de dispersão de raios-X
EDX	espectroscopia de difração de raios-X
EIT	estruturas intratubulares
ER	exposição radicular
ETf	estrutura tubuliforme
F	flúor
GLA	glicosaminoglicanas
HA	hígido adulto
HD	hipersensibilidade dentinária
HJ	hígido jovem
IJ	incluso jovem

JAD	junção amelo-dentinária
JCE	junção cimento-esmalte
K ⁺	íons potássio
Kv	quilovolt
LCNC	lesão cervical não cariosa
LCO	lesão cariosa oclusal
LCC	lesão cervical cariosa
LL	<i>lamina limitans</i>
M	molar
MET	microscopia eletrônica de transmissão
MEV	microscopia eletrônica de varredura
Mg	magnésio
mm	milímetros
Na ⁺	íons sódio
OCP	fosfato octacálcio
PO	prolongamento odontoblástico
P	fósforo
S	enxofre
Si	silício
TD	túbulo dentinário

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	27
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	35
2.1 A MICROESTRUTURA DENTINÁRIA	37
2.2 MODIFICAÇÕES MICROESTRUTURAIS DA DENTINA	44
2.3 COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ELEMENTAL DA DENTINA	58
3 PROPOSIÇÃO.....	65
4 MATERIAL E MÉTODOS	69
4.1 OBTENÇÃO DOS DENTES	71
4.2 CONSTITUIÇÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS	72
4.3 ARMAZENAGEM E PREPARAÇÃO DOS ESPÉCIMES	75
4.4 PREPARO DOS ESPÉCIMES PARA MICROSCÓPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (M.E.V.), ESPECTROSCOPIA DE DISPERSÃO DE RAIOS-X (E.D.S.) E RETROESPALHAMENTO DE ELÉTRONS (BSE)	77
4.5 ANÁLISE QUALITATIVA EM M.E.V.....	79
4.6 ANÁLISE SEMIQUANTITATIVA EM ESPECTROSCOPIA POR DISPERSÃO DE RAIOS-X (E.D.S.).....	80
4.7 ANÁLISE POR RETROESPALHAMENTO DE ELÉTRONS (BSE)	81
5 RESULTADOS	83
5.1 ANÁLISE COMPARATIVA GERAL DA MICROMORFOLOGIA DA DENTINA EM M.E.V.....	85
5.2 ANÁLISE DESCRITIVA DETALHADA DA MICROMORFOLOGIA DENTINÁRIA EM M.E.V. E BSE	87
5.3 ANÁLISE SEMIQUANTITATIVA ENTRE OS GRUPOS DE DENTES	119
6 DISCUSSÃO	127
6.1 DA METODOLOGIA	129
6.2 DA MORFOLOGIA DENTINÁRIA E ESTRUTURAS INTRATUBULARES	134
6.3 DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DAS ESTRUTURAS DA DENTINA E DAS EITs	144
7 CONCLUSÕES.....	149
REFERÊNCIAS.....	153
ANEXOS.....	167

1 Introdução

1 INTRODUÇÃO

Há tempos a natureza da dentina e de suas estruturas motivam discussões. Desde então, ela tem sido considerada um complexo biológico hidratado composto por 4 estruturas: os túbulos dentinários, parcialmente preenchidos pelos prolongamentos odontoblásticos; a dentina peritubular, altamente mineralizada, que circunda todos os túbulos; a dentina intertubular, composta principalmente de colágeno tipo I impregnado por cristais de apatita e; o fluído dentinário (MJÖR, FEJERSKOV, 1985). Portanto, a dentina é um tecido duro, vital, constituído de 50% de mineral, 30% de material orgânico e 20% de fluido, em volume (PASHLEY et al., 1996).

No entanto, a exata composição do fluido dentinário é desconhecida. Sabe-se que ele é saturado com íons cálcio e fosfato, assim como outros fluidos extracelulares. Em condições patológicas, há uma movimentação contínua desse fluido da superfície dentinária até o órgão pulpar, que parece gerar, por precipitação, a formação de depósitos minerais de vários formatos no interior dos túbulos dentinários. Ainda, diante da injúria, a polpa reage rapidamente por meio de uma resposta inflamatória a qual produz o movimento do fluido intratubular da polpa para a superfície externa afetada (PASHLEY et al., 1996). Em longo prazo, os tecidos pulpares produzem dentina terciária como resposta biológica para reduzir a permeabilidade dentinária e restaurar sua condição original (PASHLEY, 1986).

Assim, a permeabilidade dentinária é, provavelmente, um dos fatores condicionantes das reações do complexo dentinopulpar na presença de uma lesão cariosa, de procedimentos restauradores, da exposição da dentina ao meio bucal e de outras lesões que podem afetar os dentes (MJÖR, FEJERSKOV, 1985).

No entanto, o completo conhecimento das propriedades químico-estruturais relacionadas a esse substrato biológico anisotrópico é limitado. Técnicas analíticas por imagens e de espectroscopia estão sendo aprimoradas com o intuito de compreender as modificações químicas e físicas dos substratos dentinários e a dependência das suas variações com relação ao tipo de dente, preparo dos espécimes, condições de armazenagem e as interações e respostas biológicas diante dos materiais restauradores, entre outros (MARSHALL, 1993). Esses estudos conduzem a um refinamento dos conhecimentos sobre a dentina.

Portanto, sabe-se que quando algum estímulo ou agressão atingem os dentes, a dentina e a polpa reagem simultaneamente como um complexo funcional (ARNOLD; KONOPKA; GAENGLER, 2001), capaz de se defender contra as injúrias através da formação de dentina esclerótica translúcida ou, ainda, produzindo dentina terciária: reparadora ou reacional (STANLEY et al., 1983; ARNOLD; KONOPKA; GAENGLER, 2001).

A esclerose dentinária pode ocorrer, também, como um processo fisiológico, em dentina hígida de pacientes mais velhos. Ela se forma na ausência de traumas ou lesões cariosas, apenas como consequência natural da idade. Os túbulos vão sendo preenchidos gradualmente por mineral, possivelmente pelo processo de precipitação químico passivo, diminuindo a abertura dos lúmenes tubulares. O esclerosamento, nessas situações, tem sido descrito como uma aposição centrípeta de dentina peritubular no interior dos túbulos dentinários (VASILIADIS, 1983), diferentemente da esclerose dentinária por lesão cariosa, que ocorre devido à mineralização intratubular e a hipermineralização da dentina peritubular (WEBER, 1874; BLAKE, 1958; JOHANSEN; PARKS, 1962). Bradford (1958) esclarece que a formação de dentina peritubular ocorre continuamente ao longo da vida do dente, mas o grau de deposição normalmente é reduzido e, no momento em que os fluidos tissulares estão supersaturados com relação aos íons cálcio e fosfato, é necessário que algum mecanismo controle essa deposição.

A característica clínica predominante da dentina esclerosada é o aumento de sua translucidez. Entretanto, ainda persistem dúvidas a respeito do processo de formação e composição dessa dentina intratubular. Segundo alguns autores (WEBER, 1974; OGAWA et al., 1983; VASILIADIS, 1983), quando uma lesão cariosa alcança a junção amelodentinária (JAD), os prolongamentos odontoblásticos reagem produzindo dentina intratubular, sendo eles os responsáveis pela obliteração dos túbulos dentinários. Alguns trabalhos (BLAKE, 1958; JOHANSEN, PARKS, 1962; WEBER, 1974) mostraram que o grau de mineralização dessa formação intratubular é semelhante ao da dentina peritubular. Em contrapartida, outros mostraram que o material que oblitera os túbulos dentinários é quimicamente diferente da dentina peritubular (ARNOLD; KONOPKA; GAENGLER, 2001) e que o mecanismo que rege a mineralização da dentina peritubular difere da dentina intratubular (OGAWA et al., 1983). Ainda, outros estudos sugerem que a deposição de dentina intratubular ocorre devido a uma reprecipitação da dentina dissolvida pelo ácido bacteriano na forma de β -tricálcio fosfato Mg-substituto (β -TCMP), também conhecido como *whitlockite*, no interior dos túbulos (FRANK; VOEGEL, 1980; DACULSI, et al., 1987; PORTER et al., 2005).

Sabe-se que a dentina normal possui em sua constituição elemental, além do Ca e P, pequena quantidade de Mg, o qual parece influenciar não somente o metabolismo mineral através de fatores enzimáticos, mas também os possíveis efeitos no processo de cristalização da fase inorgânica (LeGEROS et al., 1991). Arnold, Konopka, Gaengler (2001) investigando a presença dos elementos Ca, P, Mg, O e C na dentina sadia, dentina desmineralizada, dentina terciária, dentina intratubular e peritubular, em dente com lesão cariosa, notaram que a proporção P/Mg na dentina intratubular foi maior quando comparada aos outros tipos de dentina, sugerindo envolvimento do Mg no processo de biomineralização. Ainda, essa mineralização intratubular foi somente vista na periferia da dentina transparente.

Após observação da dentina afetada pela lesão cariosa em M.E.T., Daculsi et al. (1979) descreveram 4 fases diferentes de alterações: a) obliteração dos túbulos dentinários por um depósito delicado, granular e amorfo; b) estreitamento tubular com aumento de espessura da dentina peritubular; c) deposição de cristais amplos de *whitlockite* obliterando totalmente os lúmenes dos túbulos e d) deposição de amplos cristais intratubulares associados a finos cristais em formato de agulha.

Com o avanço da idade dos dentes, foi possível notar mudanças no tamanho dos minerais da dentina (PORTER et al., 2005). Os autores encontraram uma diminuição na largura dos cristais intertubulares e com formato de agulha em dentes envelhecidos comparados a dentes jovens, assim como a obliteração dos túbulos dentinários por cristais com formato de lâminas. Também, diferentemente da dentina intratubular abaixo de lesões cariosas, não foi evidenciado β -tricálcio fosfato Mg-substituto combinado com apatita (DACULSI et al., 1987) e, sim, hidroxiapatita.

Outro tipo de lesão onde se observam alterações significativas na estrutura dentinária, são as lesões cervicais não cariosas (LCNC), frequentemente encontradas na prática dentária contemporânea e descritas como um fenômeno complexo e multifatorial exacerbado com o avanço da idade (LEVITCH, 1994). Os fatores etiológicos dessas lesões são a erosão, abrasão, abfração, ou a interação entre eles. Em razão da frequência com que ocorrem e da dificuldade associada ao seu tratamento e prevenção, muitos pesquisadores têm voltado seus estudos para melhor entendê-las.

Quando exposta ao ambiente oral, a dentina, também, submete-se a transformações composicionais e morfológicas significativas. Alguns autores acreditam que a superfície da dentina de LCNC torna-se hipermineralizada (GWINNETT; JENDRESEN, 1978;

MEERBEECK et al., 1994) devido ao esclerosamento dos túbulos, ocasionando sua obstrução pela justaposição da dentina peritubular e pela precipitação mineral (WEBER, 1974; VASILADIS et al., 1983; YOSHIYAMA et al., 1989; MARSHALL et al., 2000). Vários autores (DUKE; LINDEMUTH, 1991; FRANK, 1959; GWINNETT; JENDRESEN, 1978; ISOKAWA, TODA; KUBOTA, 1970, ISOKAWA; KUBOTA; KUWAJIMA, 1973; THOMAS; 1983; 1984; YOSHIYAMA et al., 1989, 1996; AZRAK, 2003) observaram que grande parte dos túbulos vistos na superfície de LCNC encontrava-se parcial ou totalmente obstruída por uma estrutura de aparência tubular, cuja natureza não está completamente clara. Essas estruturas são, aparentemente, o resultado da deposição mineral na parede interna dos túbulos, como parte da formação e espessamento da dentina peritubular por ação odontoblástica. Outros autores observaram remanescentes de depósitos minerais no interior dos túbulos dentinários, após o condicionamento ácido da superfície da LCNC, os quais sofreram desmineralização mais lenta comparados à dentina peritubular (ISOKAWA; KUBOTA; KUWAJIMA, 1973; YOSHIYAMA et al., 1989, 1996; MARSHALL et al., 2000). Ainda, os mesmos autores sugeriram que algum fenômeno também ocorre na dentina intertubular, provavelmente de natureza química, que a torna mais resistente à desmineralização. Kwong et al. (2000) puderam notar que, após o condicionamento ácido, a dentina intertubular em LCNC, diferentemente da dentina normal, mostrou-se com um aspecto granular. Em alta magnitude, a superfície granular apresentou aspecto morfológico similar aos depósitos minerais de bastões de esclerose, todos resistentes ao condicionamento ácido. Entretanto, Sakoolnamarka et al. (2005) observaram que a razão PO_4/Si na dentina profunda, abaixo da LCNC, diminuiu para níveis similares aos obtidos em dentina normal, concluindo que a dentina, nessa região, não é afetada por mudanças patológicas ou fisiológicas localizadas na superfície.

A literatura registra, ainda, a presença de uma estrutura internamente aos túbulos dentinários, com formato anelado, a qual reveste toda a parede da dentina peritubular, e que se estende desde a pré-dentina até a junção amelodentinária (JAD). Essa estrutura, claramente notada quando a dentina peritubular é removida por substâncias ácidas, é confundida com estruturas tubulares mineralizadas, encontradas em LCNCs. Considerada uma estrutura hipomineralizada (ISOKAWA; TODA; KUBOTA, 1970; SIGAL et al., 1988; PAGAVINO, 1991; THOMAS, 1983, 1984; GORACCI; MORI; BALDI, 1999; FRANK, 1999), é identificada como *lamina limitans* ou, ainda, parte do prolongamento odontoblástico (FRANK, 1999). Entretanto, a extensão real dos prolongamentos odontoblásticos no interior

dos túbulos dentinários ainda gera muita polêmica, pois muitos autores acreditam que ela se limita ao terço próximo à polpa (GORACCI; MORI; BALDI, 1999), enquanto outros, que ela se estende até a JCE (FRANK, 1999).

A face lingual oposta às LCNC, também, é de grande interesse, pois AZRAK (2003) mostrou a presença das estruturas com formato tubular somente na dentina abaixo das LCNCs. Já, CALABRIA et al. (2008) puderam notar a presença das estruturas na dentina da face lingual e vestibular, com LCNC. Devido a pouca informação, foi proposto comparar em todos os grupos deste estudo a morfologia das faces vestibulares com suas homólogas linguais.

Assim, parece claro que a composição mineral da dentina varia conforme a condição clínica do dente, embora tal relação de causa e efeito ainda não esteja completamente estabelecida. As propriedades físico-químicas da dentina sofrem modificações dependentes dessas variáveis. Pode-se prever, portanto, que a dentina normal em um dente jovem, a dentina normal em um dente adulto, a dentina cariada, a dentina em LCNC ou somente a exposição dentinária, suscitam diferentes abordagens e estratégias, facilitando na escolha da terapia para as afecções dentais. Dúvidas ainda persistem quanto a essas propriedades quando influenciadas por todos esses fatores já que, aparentemente, eles conferem diferentes reações ao complexo dentinopulpar. Sendo assim, este trabalho foi desenvolvido com o intuito auxiliar na compreensão dos fenômenos que acompanham as alterações estruturais da dentina, sob diferentes condições clínicas, por meio de recursos analíticos específicos.

2 Revisão de Literatura

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A MICROESTRUTURA DENTINÁRIA

O conhecimento das estruturas fundamentais da dentina se completou na segunda metade do século XIX graças ao estudo da anatomia dentária pela microscopia. Historicamente, a descoberta da estrutura dentinária se deve a J. Thomes, em 1856, pela observação do conteúdo fibrilar do túbulo o qual, por muito tempo, recebeu o nome de prolongamento de Thomes, hoje chamado processo odontoblástico (GORACCI et al., 1993; GORACCI; MORI, 1995). Com a invenção da Microscopia Eletrônica de Varredura (M.E.V.), em seguida, foi possível analisar a estrutura dentária dura, com um baixo conteúdo de água e com o mínimo de contração no término do preparo do espécime.

O M.E.V. constitui um válido método para observação da dentina, pela relativa facilidade do preparo dos espécimes comparado àquele necessário para análise em microscópio eletrônico de transmissão (M.E.T.), mas, sobretudo, pela facilidade de o feixe de elétron refletir no espécime e proporcionar imagens tridimensionais. O preparo da estrutura dentária é relativamente simples e compreende basicamente o processo de desidratação e deposição de uma camada de metal para refletir a imagem (GORACCI; MORI, 1995).

Sabe-se que a maior parte da estrutura dentária é constituída pela dentina, um tecido parcialmente mineralizado, envolto por matriz de colágeno (MONDELLI et al., 1998). Essas estruturas têm íntima relação com os prolongamentos odontoblásticos adquirindo, assim, uma característica tubular (BUTLER, 1995). No total, a dentina é composta por cerca de 50% de mineral, 30% de material orgânico e 20% de água (MJÖR; FEJERSKOV, 1985; DRIESSENS; VERBEECK, 1993). Pode-se considerá-la como um complexo hidratado composto por quatro elementos: 1- túbulos dentinários preenchidos por prolongamentos celulares, 2- fluidos, 3- uma dentina peritubular altamente mineralizada e 4- pela dentina intertubular, menos mineralizada, constituída de colágeno e depósito de cristais de apatita pobre em cálcio (BUTLER, 1992; MARSHALL JR., 1993).

O conteúdo mineral da dentina é encontrado em duas áreas: na dentina intertubular, entre os túbulos dentinários, em íntimo contato com as fibrilas colágenas, e concentrado na

dentina peritubular. Os cristais de apatita, muito menores (aproximadamente 5 x 30 x 100 nm) que a apatita encontrada no esmalte e, portanto, mais difíceis de serem estudados, contêm 4-5% de carbonato quando comparado à hidroxiapatita (MARSHALL JR., 1993; MARSHALL et al., 1997). A menor quantidade de cálcio e alto conteúdo de carbonato levam a uma alta solubilidade diante dos ácidos, ou seja, alta vulnerabilidade à formação de lesões cariosas (LeGEROS, 1991).

Portanto, cada túbulo dentinário possui um colar de dentina peritubular hipermineralizada, rica em minerais de hidroxiapatita e concentração insignificante de colágeno, e a dentina intertubular, rica em colágeno. (COSTA; MESAS; HEBLING, 2000). Weiner et al. (1999) mostraram que a organização dos cristais na dentina peritubular é muito semelhante à da dentina intertubular e que a interface entre as duas dentinas se mostrou contínua. Sendo assim, os dois tecidos mineralizados, formados de apatita carbonatada, podem se organizar e se formar em um mesmo órgão utilizando diferentes proteínas da matriz.

Os túbulos dentinários, característica distinta e importante da dentina, vão desde a junção cimento-esmalte (JCE) ou junção amelodentinária (JAD) até a câmara pulpar. Cada túbulo dentinário é como um cone invertido, com uma pequena dimensão próxima à JCE, na raiz, e à JAD, na coroa, e ampliando essa dimensão em direção à polpa (PASHLEY, 1996; GORACCI; MORI, 1995). Sendo assim, a densidade e a orientação tubular variam de local para local (MARSHALL et al., 1997). A área ocupada pelos túbulos dentinários e o diâmetro deles, da dentina oclusal, foi calculada por Pashley (1986), variando em torno de 22% e 2,5µm, próximo à polpa, e 1% e 0,8µm, próximo à JAD, respectivamente.

Na dentinária intertubular, as fibras colágenas constituem o maior componente estrutural da matriz. Essa matriz orgânica é constituída aproximadamente por 90% de colágeno tipo I e geralmente é uniforme em composição e conformação por todo o tecido (BUTLER, 1992). Outras proteínas não colagênicas e componentes orgânicos como lipídios e mucopolissacarídeos constituem cerca de 0,2% do conteúdo dentinário, e contêm um pouco menos de 1% de ácido cítrico (GORACCI; MORI, 1995). Entretanto, as funções desses componentes não foram bem estabelecidas (MARSHALL et al., 1997). A quantidade da dentina intertubular também é variável de acordo com a sua localização, sendo de 12% na região próxima à pré-dentina a 96% próxima à JAD (MARSHALL et al., 1997).

As fibrilas colágenas na dentina normal apresentam um arranjo ortogonal aos túbulos dentinários, formando uma rede da matriz da dentina intertubular completamente assistemática. Acredita-se que existam dois mecanismos envolvidos na formação dos cristais de apatita que compõem a dentina: a nucleação das vesículas e as proteínas não colagenosas que regulam a deposição dos cristais de apatita em relação à orientação das fibrilas de colágeno. Ou seja, uma vez que a apatita sofre nucleação, o ambiente influencia no crescimento dos cristais e determina a forma, também. As proteínas não colagenosas são capazes de conectar seletivamente os cristais às diferentes superfícies, inibindo seu crescimento em certas direções e, portanto, gerando cristais de diferentes formas, como formato de lâmina e agulha e, na ausência da inibição, no formato de blocos (ZAVGORODNIY; ROHANIZADEH; SWAIN, 2008).

Os túbulos dentinários são preenchidos pelo fluido dentinário, constituído quase totalmente de água, uma quantidade significativamente grande, que irriga e dá flexibilidade à dentina. Isso reflete na variabilidade do conteúdo de água nos dois extremos da dentina, já que existem túbulos em maior quantidade e de maior diâmetro na dentina profunda. Entretanto, a completa composição do fluido dentinário é desconhecida, aparentemente formada por um produto iônico de cálcio e fosfato, semelhante ao produto de solubilidade de várias formas do fosfato de cálcio. Isso, aparentemente, tende a formar depósitos minerais no interior dos túbulos e em diferentes formas, desde que esse fluido apresente uma grande quantidade de íons minerais que se movam externamente para as paredes dos túbulos dentinários, podendo ocorrer, por difusão, o selamento desses túbulos (MJÖR; FEJERSKOV, 1985).

Além do fluido, os prolongamentos odontoblásticos também fazem parte do conteúdo tubular. Os corpos celulares dos prolongamentos odontoblásticos estão separados da dentina mineralizada por uma área de matriz orgânica não mineralizada denominada pré-dentina. Os prolongamentos odontoblásticos penetram os túbulos dentinários através dessa pré-dentina (DUKE; LINDEMUTH, 1991). A função exata dos odontoblastos ainda é incerta. A natureza precisa das respostas dos odontoblastos ao envelhecimento dentário e aos vários tipos de injúrias – procedimentos operatórios e doenças - que acometem os dentes merece mais investigações (FRANK, 1999). Ainda, a real extensão dos prolongamentos odontoblásticos no interior dos túbulos dentinários ainda é controversa. Alguns autores mostraram que os prolongamentos não alcançam mais do que o terço dentinário próximo à polpa (GARBEROGLIO; BRÄNNSTRÖM, 1976; THOMAS; CARELLA, 1983; 1984; THOMAS, 1984; FOX; SENIA; ZEAGLER, 1984; FRANK; STEUER, 1988; GORACCI; MORI;

BALDI, 1999; YOSHIBA et al., 2002). Outros autores acreditam que os prolongamentos penetram a dentina chegando até a JAD, e que a interpretação “errônea” dos outros estudos se deve ao fato de uma inadequada fixação dos tecidos dessas estruturas em suas porções mais externas, levando à contração dos prolongamentos durante o preparo dos espécimes (KELLEY; BERGENHOLTZ; COX, 1981; MANIATOPOULOS; SMITH, 1983; FOX et al., 1984; SZABÓ; TROMBITÁS; SZABÓ, 1985; SIGAL; CHERNECHY, 1988; GRÖTZ et al., 1998; FRANK, 1999; GRÖTZ et al., 2000; 2003). Em resposta, os autores que suportam a hipótese dos prolongamentos chegarem, no máximo, a uma distância de 0,5–0,7mm na dentina, acreditam que o que é observado próximo à JAD é uma membrana hipomineralizada, extracelular, constituída por glicosaminoglicanas e glicoproteínas, denominada *lamina limitans* (LL) (ISOKAWA; TODA; KUBOTA, 1970; THOMAS, 1979; MANIATOPOULOS; SMITH, 1983; THOMAS; CARELLA, 1983; 1984; THOMAS, 1984; PAGAVINO; PACE; PIERLEONI, 1991; GORACCI et al., 1993; GORACCI; MORI; BALDI, 1999). Esses mesmos autores relataram que essa estrutura membranosa se torna muito mais nítida após o processo de desmineralização pois, com a dissolução da dentina peritubular, ela fica livre no interior dos túbulos dentinários. Alguns autores, ainda, consideram a LL como parte do prolongamento odontoblástico, mais propriamente sua bainha externa composta de tecido mucoide (BRADFORD, 1950; MILLER, 1954; FRANK, 1959). Além disso, essa estrutura pode ser vista por toda a extensão dos túbulos dentinários, desde a pré-dentina até a JAD e, ainda, na dentina terciária onde ocorre a morte dos prolongamentos, sendo interpretada impropriamente como prolongamento odontoblástico. Szabó, Trombitás e Szabó (1985) observaram a presença dos prolongamentos odontoblásticos e da LL simultaneamente e por toda a extensão dos túbulos dentinários, ou seja, da pré-dentina até a JAD. Ainda, os autores observaram que a maior parte dos túbulos possuía apenas a LL, sugerindo que os prolongamentos odontoblásticos apresentam diferentes comprimentos e que apenas alguns deles possuem o mesmo comprimento de seu respectivo túbulo. Entretanto, as funções fisiológicas da LL ainda têm que ser definidas (PAGAVINO; PACE; PIERLEONI, 1991). No osso e na cartilagem, ela constitui uma barreira que parece regular as trocas de substâncias entre o plasma e a matriz mineralizada (GORACCI; MORI; BALDI, 1999). Sendo assim, Thomas e Carella (1983) sugeriram que deve haver alguma função similar entre o fluido dentinário e a dentina peritubular, a qual controla a formação dessa dentina e da esclerose tubular. Segundo Ten Cate (1998), a LL pode ser um artefato de técnica devido ao preparo dos espécimes. Entretanto, se a LL fosse um artefato criado pela precipitação de proteínas não colagênicas do fluido dentinários, a mesma estrutura seria vista no nível da pré-

dentina e por toda a membrana celular do prolongamento odontoblástico, o que não ocorreu (YOSHIBA et al., 2002).

Saber a extensão dos prolongamentos odontoblásticos é importante por várias razões. Se os odontoblastos participam diretamente do mecanismo de sensibilidade dentinária, quando a superfície é estimulada, significa que o estímulo interage diretamente com o citoplasma celular. Caso contrário, se ele não alcança a superfície dentinária, os odontoblastos não estão envolvidos diretamente no processo de sensibilidade. Quando preparamos cavidades em dentina profunda, durante os procedimentos restauradores, os odontoblastos são amputados e, portanto, irritando o corpo celular que se encontra na polpa (PASHLEY, 1996).

Ainda, a exata relação entre prolongamentos e fibrilas nervosas não está clara. Alguns autores (FRANK, 1968; SZABÓ; TROMBITÁS; SZABÓ, 1984) sugeriram a presença de fibrilas nervosas penetrando no interior dos túbulos dentinários próximos aos prolongamentos odontoblásticos. Frank; Steuer (1988) observaram, em microscopia eletrônica de transmissão, fibrilas nervosas não mielinizadas próximas aos prolongamentos odontoblásticos na dentina periférica. Se isso for realmente validado, na verdade temos uma ativação direta dos estímulos nociceptores pela ativação direta das terminações nervosas. Entretanto, os autores aludem que essa fibra que acompanha o prolongamento pode ser uma ramificação do mesmo processo, o qual se divide no interior do túbulo próximo à polpa ou, ainda, uma ramificação de outro prolongamento, que se estende para outro túbulo dentinário. Inoue et al. (1995) especularam que essa proximidade poderia ter algum efeito sobre as funções dos odontoblastos.

Em dentes recém-erupcionados, não foi observada a presença da dentina peritubular próxima à pré-dentina (DUKE; LINDEMUTH, 1991). Goracci e Mori (1995), com o objetivo de observar as mudanças morfológicas nas estruturas tanto na dentina como nos túbulos dentinários, em dentes saudáveis, realizaram análises em M.E.V. em diferentes níveis de amostras de dentina, de acordo com a distância pulpar. Após a remoção dos odontoblastos, a pré-dentina apareceu apenas composta por fibrilas de colágeno e com 15µm de espessura. Nesse mesmo nível, os túbulos dentinários apresentaram um diâmetro de 4µm e esse valor foi diminuindo progressivamente à medida que a dentina foi se distanciando da polpa. A superfície interna dos túbulos apareceu lisa e mostrou a confluência de muitos canalículos laterais. Os túbulos dentinários terminavam formando ramificações que se difundiam externamente até entrarem em contato com a superfície do esmalte.

Os túbulos dentinários apresentam ramificações laterais que passam através da dentina intertubular, conectando-se com outros túbulos, formando um tipo de rede tridimensional (CARDA; PEYDRÓ, 2006). De acordo com Mjör & Nordahl (1996), há três tipos de ramificações dos túbulos: as ramificações terminais, as ramificações finas e as microrramificações. As grandes ramificações terminais são o grupo de ramificações com maior diâmetro (0,5-1,0 μ m). Elas são regularmente encontradas nos 250 μ m mais periféricos da dentina, isto é, próximo à JAD e à JCE. Elas têm uma forma típica de “Y”, estão em maior número na coroa do que na raiz e terminam como ramificações em delta. As ramificações finas têm diâmetro menor (300-700nm) e se estendem perifericamente aos túbulos principais em ângulos de 45°, penetrando na dentina intertubular. Elas podem cruzar até cinco túbulos principais e, geralmente, se anastomosam com outras ramificações finas de outros túbulos. Tanto as ramificações terminais como as finas podem ser vistas em microscopia ótica e apresentam dentina peritubular. São mais numerosas na parte média das raízes e são pouco numerosas na porção principal da dentina coronária (devido a uma maior densidade de túbulos principais nesta área). As microrramificações só podem ser vistas através da microscopia eletrônica. Apresentam diâmetro entre 25-200nm (a maioria tem diâmetro de 50-100nm) e não possuem dentina peritubular, podem ocorrer em qualquer região dentinária do dente e partem perpendicularmente aos túbulos principais, penetrando na dentina intertubular, onde se ramificam e se anastomosam com outras microrramificações de outros túbulos. Suas ramificações secundárias podem ocorrer em todas as direções, enquanto que nos outros tipos isso só ocorre em direção à periferia da dentina.

Muyllé et al. (2000) observaram, em dentes de cavalos, após o condicionamento ácido de espécimes fraturados longitudinalmente, túbulos dentinários circundados internamente por uma trama de fibrilas de colágeno. A principal direção dessas fibrilas era perpendicular ao longo eixo dos túbulos. Nos espécimes não desmineralizados, foram observadas fibrilas entrelaçadas circundando os túbulos, somente próximo à cavidade pulpar. Mais perifericamente, a parede interna dos túbulos aparentou-se lisa, pois a dentina peritubular mascarou a presença das fibrilas. Também foi possível observar no lúmen tubular fibras delgadas passando paralelamente às suas paredes, sendo que alguns túbulos possuíam uma única fibrila e, outros, muitas fibrilas agregadas. Além disso, as fibrilas presentes mais próximas à cavidade pulpar mostraram-se mais espessas comparadas àquelas próximas à JAD.

O colágeno é um constituinte significativo do conteúdo tubular (DAI et al., 1991), incidindo em mais de 60% dos túbulos dentinários de dentes humanos. Nem a idade nem a

função dentária são fatores determinantes na presença das fibrilas intratubulares, que também estão presentes em dentes cariados ou com atrição. Logo, essas fibrilas não se formam em resposta à irritação (HOLLAND, 1994). O colágeno intratubular é produzido pelos odontoblastos e, portanto, sua distribuição reflete a atividade dessas células. Consequentemente, não é surpresa que a concentração de colágeno seja maior nas regiões próximas à polpa (DAI et al., 1991). Os odontoblastos também são responsáveis pela formação das fibrilas de colágeno intertubulares (TEN CATE, 1998). O mecanismo que rege as mudanças na orientação das fibrilas de colágeno da dentina intertubular para a dentina intratubular, paralelas ao prolongamento odontoblástico, ainda, é desconhecido, assim como a relação entre a dentina peritubular não colagênica e as fibrilas de colágeno passando através dela (HOLLAND, 1994).

Johansen e Parks (1962) observaram, analisando espécimes de dentina desmineralizados, uma rede de fibrilas de colágeno na matriz dentinária. Uma rede densa de fibrilas de colágeno com espessura de 600-700Å de diâmetro caracterizava a dentina intertubular. A matriz dentinária da dentina peritubular apresentou fibrilas menores e esparsas, com 250-500Å e a pré-dentina apresentou espessura de fibrilas de tamanho intermediário, com 400-500Å, sendo que a maioria estava paralela aos prolongamentos odontoblásticos, embora algumas fibras individuais ou grupo de fibras seguissem perpendicularmente a eles. Ainda puderam observar a presença das fibrilas de colágeno no interior dos lúmenes dos túbulos dentinários. Frank (1959) notou que as fibrilas da dentina intertubular estão em continuidade com as fibrilas da dentina peritubular, e que existe uma conexão entre as fibrilas dos prolongamentos odontoblásticos e a matriz de ambas as dentinas. Também, finas fibrilas de colágeno foram vistas associadas a uma membrana que revestia internamente os túbulos dentinários. Szabó, Trombitás e Szabó (1985) notaram uma rede de fibrilas entre a parede mineralizada da dentina peritubular e uma membrana com formato anelar, margeando toda essa parede.

No entanto, apesar do significativo progresso com relação ao conhecimento da morfologia da dentina, é preciso que haja um melhor entendimento do complexo mecanismo que envolve a deposição inicial de minerais e seu desenvolvimento, a íntima relação entre os cristais de apatita e as proteínas colagênicas e não colagênicas e com os componentes lipídicos e carboidratos.

2.2 MODIFICAÇÕES MICROESTRUTURAIS DA DENTINA

Desde o estágio de desenvolvimento até seu amadurecimento, a dentina sofre transformações no grau de mineralização de suas estruturas (GORACCI; MORI, 1995). As variações dentinárias mais citadas na literatura incluem a dentina secundária, terciária, esclerótica, transparente, cariada, desmineralizada, remineralizada e hipermineralizada. Elas refletem alterações nos componentes fundamentais da estrutura dentinária, como no arranjo e na interrelação das estruturas, levando às modificações morfológicas e também em sua composição química (MARSHALL et al., 1997). No entanto, essas modificações são pobremente definidas do ponto de vista estrutural e de suas propriedades.

Conforme a idade do indivíduo, as mudanças minerais podem ocorrer fisiologicamente, como um processo contínuo, sendo que depois da formação da dentina primária os odontoblastos continuam a formar dentina de maneira mais lenta (dentina secundária); ou, patologicamente quando, na presença de determinados estímulos, forma-se a dentina terciária, a curto, médio e longo prazo, como uma forma de resposta do complexo dentinopulpar (MJÖR; HEYERAAS, 2001). A dentina primária é bem mais organizada que a dentina secundária, mas ambas são formada ao longo do limite pulpodentinário. Entretanto, a dentina terciária se forma adjacente ao local de irritação, é extremamente irregular, podendo, ainda, ser atubular (DUKE; LINDEMUTH, 1991; MURRAY et al., 2003).

Na literatura, alguns autores, como Murray et al. (2003); Mjör et al. (2002); BjØrndal; Darvan (1999), dividem a dentina terciária em três tipos: o primeiro é aquele cujas células formadoras da nova dentina são os odontoblastos já existentes na polpa (dentina reacional); o segundo é aquele formado por células semelhantes a odontoblastos (dentina reparadora); o terceiro é um tipo de dentina atubular (com ou sem inclusões celulares) formada por células semelhantes a fibroblastos. A dentina atubular é formada em situações de forte agressão, as quais provocam uma sensação dolorosa mais intensa, como nos estágios mais ativos das lesões cariosas.

Apesar da diferença na estrutura e composição, a polpa e a dentina estão integralmente conectadas. As reações fisiológicas e patológicas que ocorrem em uma delas também irão afetar a outra. Ambas possuem relação com a vitalidade do dente (MJÖR et al., 2002). Por isso dentina e polpa são consideradas, há muitos anos, como um complexo dentinopulpar

devido sua origem comum a partir da papila dentinária e a ampla relação existente entre sua formação e função (COSTA; MESAS; HEBLING, 2000; MONDELLI, 1976; MONDELLI, 1998).

A polpa é um tecido altamente especializado, ricamente innervado, vascularizado e responsável pela vitalidade do dente. Ocupa a cavidade pulpar, formada pela câmara pulpar e canais radiculares. Guarda relação com a dentina tubular e a pré-dentina e nela se distinguem as seguintes estruturas: camada odontoblástica, zona acelular de Weil, zona rica em células e tecido pulpar profundo. A camada odontoblástica é formada por células altamente diferenciadas (odontoblastos), responsáveis pela produção de dentina desde a formação do dente até a degeneração da polpa. A principal função da polpa é produzir dentina (função formativa). Mas também apresenta funções como: nutritiva (nutre a dentina através dos prolongamentos odontoblásticos) e de proteção, manifestando-se através da dor quando um verdadeiro mecanismo de defesa é acionado cada vez que as estruturas dentárias são estimuladas (MONDELLI, 1998).

A habilidade de o complexo dentinopulpar responder aos estímulos patológicos como cárie, atrição, abrasão, erosão, e aos procedimentos restauradores e materiais odontológicos, por meio da formação de tecido mineralizado, é conhecida há muito tempo (MJÖR, 2002). Enquanto houver atividade odontoblástica, haverá deposição mineral no interior dos túbulos, o que ocorre na superfície da dentina peritubular da JAD em direção à polpa. Como resultado, a dentina peritubular vai-se distanciando da polpa e aumentando em espessura e, com o tempo, pode obliterar completamente o orifício dos túbulos dentinários (DUKE; LINDEMUTH, 1991). Portanto, inicialmente, o tecido responde através desse fenômeno chamado esclerosamento dentinário (STANLEY, et al. 1983; BØRNDAL; DARVANN; THYLSTRUP, 1998) por essa deposição de dentina peritubular em regiões subjacentes às injúrias, o que reduz o diâmetro dos túbulos dentinários. Esse é um mecanismo de defesa importante em relação às agressões externas e que tem como a mais importante consequência tornar a dentina menos permeável (MJÖR, 2002). Posteriormente, essa resposta é, geralmente, demonstrada pela deposição localizada de uma matriz de dentina terciária nas proximidades da agressão (MARSHALL JR. et al. 1997). Há também situações em que os odontoblastos e seus prolongamentos se degeneram, deixando os canalículos abertos, formando o que chamamos de tratos mortos da dentina (MONDELLI, 1998).

Existe, portanto, um consentimento de que a dentina esclerótica, independentemente do tipo de estímulo responsável pelo início de sua formação, ocorre devido a uma neoaposição da dentina peritubular associada à deposição de cristais intratubularmente, apesar de haver, ainda, debates de como isso ocorre. Bastões de esclerose são formados no interior dos túbulos dentinários podendo obliterá-los completamente ou apresentar, ainda, uma cavidade central, lembrando um anel. Sabe-se que a dentina esclerótica apresenta um aumento em seu componente mineral, mas não está claro se esse fato se deve a apenas a um aumento quantitativo ou a uma hipermineralização daquela dentina pré-existente (GIACHETTI, et al., 2002). No decorrer do texto, a literatura revela numerosas hipóteses ao redor da formação da dentina esclerótica, por exemplo, descrevendo-a como um fenômeno passivo de dissolução e reprecipitação mineral, enquanto outros sugerem envolvimento dos prolongamentos odontoblásticos e da polpa. Entretanto, pouco se conhece a respeito do controle biológico da aposição de dentina peritubular (PASHLEY, 1996). Presumidamente, esse é um processo de deposição mineral lento, menor que a formação de dentina secundária na câmara pulpar, e que pode ser acelerado por várias formas de irritação pulpar (MENDIS; DARLING, 1976). Também, poucas informações estão disponíveis a respeito das diferenças existentes entre o processo de esclerosamento fisiológico e patológico e, mesmo, sobre eles individualmente (WEBER, 1974).

Tentando obter informações sobre as diferenças entre a esclerose fisiológica e patológica, Weber (1974), usando a microrradiografia de finas secções dentinárias, comparou as imagens de dentes não irrompidos envelhecidos, afetados por lesão cáriosa incipiente e lesão cáriosa avançada. Concluiu-se que existe diferença entre os tipos de esclerose nas diferentes condições e que a maior diferença está na quantidade de túbulos obliterados. As imagens mostraram uma menor porcentagem de túbulos obliterados na dentina esclerótica fisiológica e grande porcentagem na dentina esclerótica patológica. Ainda, esta última mostrou uma hipermineralização da dentina peritubular e a mineralização da dentina intratubular. O conteúdo intratubular mostrou uma grande radiodensidade, comparativamente maior que o da dentina peritubular. Apesar do aumento de radiopacidade da dentina intertubular, esta não alcançou o grau de densidade da dentina peritubular. Não foi notada obliteração significativa dos túbulos dentinários em dentes não irrompidos, indicando que o processo de esclerosamento fisiológico inicia somente quando o dente é submetido aos estresses do ambiente oral. Vasiliades; Darling; Levers (1983) também puderam notar que, nas regiões com esclerose dentinária, o material que obstruía os túbulos mostrou-se sempre

mais radiodenso quando comparado com a dentina intertubular e, portanto, menos mineralizado. A zona de esclerose apresentou absorção de raios-X semelhante ao da dentina peritubular. A dentina intertubular, nas regiões de esclerose, mostrou o mesmo nível de absorção de raios-X da dentina intertubular em regiões de dentina normal. A dentina intertubular apresentou-se com um aspecto rugoso, enquanto que, o material obliterador e a dentina peritubular evidenciaram aspecto liso e homogêneo. Entretanto os autores sugerem que, apesar da absorção de raios-X serem semelhantes, o material obliterador não é uma continuação da dentina peritubular, pois quando os espécimes foram fraturados para análise em M.E.V., essas estruturas em forma de roda se separaram da parede da dentina peritubular. Ainda, os autores notaram que essas estruturas em forma de roda eram formadas por cristais compactados.

Dessa forma, a permeabilidade da dentina é, possivelmente, uma das propriedades mais importantes que influencia na extensão da reação pulpar em muitas situações clínicas (PASHLEY, 1986). O número de túbulos por mm^2 varia de 15.000, próximo à JAD e a 65.000 próximo à polpa (GARBEROGLIO; BRÄNNSTRÖM, 1976). Assim, como o diâmetro e a densidade dos túbulos aumentam conforme se distanciam da JAD, a permeabilidade é menor próxima a ela. No entanto, diferentemente do previsto pelos cálculos matemáticos, a variação na permeabilidade depende da área, das irregularidades tubulares associadas à deposição mineral, componentes inorgânicos dos prolongamentos odontoblásticos, depósitos de colágenos intratubulares e qualquer coisa que reduza a condutibilidade dos fluidos dentro dos túbulos (PASHLEY, 1986; 1996; MJÖR et al., 2002).

Dentes com a dentina exposta podem gerar desconforto para o paciente devido à hipersensibilidade dentinária (HD). Quase todos os estímulos responsáveis por causar hipersensibilidade dentinária estão relacionados à rápida movimentação dos fluidos nos túbulos quando aquela se torna exposta à cavidade bucal (BRÄNNSTRÖM; JOHNSON; NORDENVALL; 1979). A condição que fundamenta a teoria hidrodinâmica é que a dentina sensível é a dentina permeável (PASHLEY, 1986). De acordo com essa teoria, o fluxo do fluido no interior dos túbulos estimula indiretamente as terminações nervosas da polpa (BRÄNNSTRÖM, 1962). Sendo assim, se a teoria hidrodinâmica da dentina sensível está correta, qualquer substância que obstrua os túbulos dentinários expostos ou diminua o movimento dos fluidos dentinários deverá diminuir ou eliminar a HD. Sabe-se, também, que nem todo paciente com dentina cervical exposta apresenta HD (RIMONDINI; BARONI; CARRASSI, 1995). O próprio ambiente oral, assim como a natureza da dentina, pode

contribuir para reduzir a sensibilidade da dentina (ABSI; ADDY; ADAMS; 1987; BRÄNNSTRÖM; JOHNSON; NORDENVALL; 1979).

Absi, Addy, Adams (1987) compararam dentes com exposição radicular com HD e não sensíveis. Os dentes com HD mostraram um aumento significativo de túbulos por área (8 vezes mais) comparados aos não sensíveis, assim como o diâmetro, 2 vezes maior. Concordando com os achados de Absi, Addy, Adams (1987), Rimondini, Baroni, Carrassi (1995) notaram, ainda, que a *smear layer* recobrindo a superfície dos dentes com HD mostrou-se delgada e pouco calcificada, diferente daquela vista na superfície de dentes não sensíveis, com um aspecto amorfo e com uma *smear layer* espessa. De acordo com Pashley et al. (1986), a *smear layer* é responsável pela maior resistência da movimentação do fluido através da dentina.

Normalmente, a dentina é coberta por esmalte em sua porção coronal e por cemento em sua porção radicular. Toda vez que a dentina é exposta, a polpa é colocada em risco por causa da alta permeabilidade da dentina normal, pois o fluido intratubular, que preenche os túbulos dentinários, fica livre para se movimentar em resposta aos estímulos térmicos, osmóticos e táteis. O movimento desse fluido através dos túbulos é capaz de causar irritação mecânica, desordem e danos, dependendo da intensidade da força do movimento nos odontoblastos, terminações nervosas, fibroblastos e vasos sanguíneos. Na ausência dos movimentos desse fluido, os túbulos preenchidos pela água se tornam vias para substâncias nocivas (como as bactérias) penetrarem na polpa e aí se difundirem. Em curto tempo, a polpa responde a esses insultos com uma resposta inflamatória que causa um movimento do fluido externamente à polpa (PASHLEY, 1996). Tanto o fluxo contínuo do fluido vindo da polpa como os componentes orgânicos e os sais da saliva podem contribuir com as alterações na dentina (BRÄNNSTRÖM; JOHNSON; NORDENVALL; 1979). Em longo prazo, o tecido pulpar produz dentina terciária, como uma resposta biológica responsável pela redução da permeabilidade do complexo dentinopulpar e com a intenção de devolver a condição normal desse complexo (PASHLEY, 1996).

Podem-se observar diferentes padrões de repostas que levam à redução na permeabilidade dentinária. Se o novo odontoblasto não estiver alinhado com o túbulo dentinário da dentina primária, o novo túbulo não será contínuo a ele, reduzindo a permeabilidade. Ainda, muitas vezes, o novo odontoblasto não possui prolongamento, formando, portanto, a dentina atubular que selará a dentina primária, reduzindo a

permeabilidade a quase zero. Outra reação comum da dentina exposta é a deposição de cristais minerais no interior do lúmen tubular (PASHLEY et al., 2002). A permeabilidade na dentina esclerótica é muito menor quando comparada à dentina sadia (TAGAMI et al., 1992), independente do fator causal que induziu a esclerose. Às vezes, esses cristais chegam a obliterar completamente os túbulos, deixando a dentina impermeável (PASHLEY et al., 2002). Ainda, se a superfície dentinária é exposta por um período e o ambiente oral é favorável, o que inclui a saliva, uma fina camada de dentina hipermineralizada pode ser observada na superfície, podendo bloquear os túbulos rápida e razoavelmente.

De fato, muitos pacientes com problemas periodontais pós-cirúrgicos exibem recuperação espontânea da HD em um período de 1 a 2 semanas, o que sugere que a dentina realmente se torna menos permeável com o tempo. Uma variedade de mecanismos físico-químicos guia a redução da permeabilidade e, dessa forma, da HD (PASHLEY, 1986).

Além dos eventos citados anteriormente, Brännström, Garberoglio (1980) reportaram um experimento utilizando segmentos dentários, sem a raiz, com a câmara pulpar vedada e com o esmalte das cúspides oclusais removido, simulando abrasão dentária. Esses segmentos foram adaptados a um dispositivo, simulando uma dentadura, utilizados pelos pacientes. A análise em microscopia mostrou a formação de pequenos cristais no interior do lúmen tubular junto à dentina peritubular. Os autores concluíram que esses pequenos cristais só podem ter se originado dos fluidos orais. Como a composição do fluido dentinário é tipicamente semelhante à do fluido extracelular, com alta concentração de Na^+ , baixa de K^+ , com proteínas do plasma e saturado de íons cálcio e fosfato, pode-se esperar uma reação físico-química natural no interior dos túbulos, em cujas paredes da dentina peritubular os sais de fosfato de cálcio foram depositados.

Portanto, a dentina não sensível é aquela exposta e com os túbulos dentinários obstruídos, não somente pela formação de uma dentina irregular, mas também por depósitos minerais, pela adsorção das proteínas do plasma para o interior das paredes tubulares, pela formação de uma *smear layer* na superfície dentinária ou pela mineralização da camada mais superficial da dentina (BRÄNNSTRÖM; JOHNSON; NORDENVALL; 1979; BRÄNNSTRÖM; GARBEROGLIO, 1980; PASHLEY, 1986).

A expressão lesão cervical define toda a alteração que consiste na perda de estrutura dentária localizada ao longo da junção cimento-esmalte (JCE) e pode ser mais especificamente definida como lesão cervical cariada, onde o desenvolvimento da lesão

ocorre na presença de microrganismos na superfície dental e lesão cervical não cariada (LCNC). A LCNC é caracterizada pela perda de tecido mineralizado no terço cervical do dente, na ausência do processo carioso, e a base da lesão aparece constituída por um tecido duro e altamente mineralizado (ERAMO et al., 2003; CERUTI et al., 2006). Essas lesões se apresentam de diferentes formas, tais como ranhuras rasas, lesões amplas em forma de pires e até grandes defeitos em forma de cunha, com ângulos nítidos ou com margens mal definidas abaixo da JCE. Esses defeitos podem ocorrer nas superfícies vestibulares, onde são mais frequentes, assim como nas superfícies linguais e interproximais dos dentes (LEVITCH et al., 1994).

Os fatores que induzem à formação das LCNC não foram, ainda, completamente compreendidos (PEGORARO et al., 2005). Apesar das suas características próprias, o diagnóstico nem sempre é imediato (GALLIEN; KAPLAN; OWENS, 1994; ERAMO et al., 2003; PEGORARO et al., 2005). As LCNC são classificadas fundamentalmente de acordo com o mecanismo de causa inicial das lesões: abrasão, erosão, atrição e abfração ou lesão de estresse oclusal (GRIPPO, 1991; LEE; EAKLE, 1996; GALLIEN; KAPLAN; OWENS, 1994; MAYHEW; JESSEE; MARTIN, 1998; EDWARDS et al., 1999; ERAMO et al., 2003; LITONJUA et al., 2003; CERUTTI et al., 2006) e, de acordo com a literatura, conclui-se que sejam as terminologias mais aceitas para a perda dos tecidos duros dos dentes sem que haja envolvimento da doença cárie. Sabe-se, também, que os dentes que apresentam LCNC podem apresentar HD, pois essas lesões normalmente levam à exposição dentinária.

A dentina da região cervical, com relação às LCNC, apresenta característica morfológica peculiar (ERAMO et al., 2003). A hipermineralização da dentina intertubular, depósitos de substâncias inorgânicas nos túbulos dentinários e o desenvolvimento da dentina peritubular têm sido citados como algumas das alterações encontradas em dentina de LCNC (ISOKAWA; KUBOTA; KUWAJIMA, 1973). Entretanto são limitadas as informações sobre as modificações na morfologia e composição que acompanham o desenvolvimento dessas lesões (DUKE; LINDEMUTH, 1991). Sabe-se, também, que a perda de estrutura dentária nas LCNC é frequentemente marcada pela formação de uma dentina esclerótica ou translúcida, desde que os depósitos minerais obliterem a abertura dos túbulos dentinários. Provavelmente, tais depósitos guiam a um aumento na dureza e induzem a mudanças nas características ópticas da dentina, deixando-a com uma aparência transparente e vítrea (VASILIADES; DARLING; LEVERS, 1983; YOSHIYAMA et al., 1989; 1990; 1996).

Yoshiyama et al. (1989) e Yoshiyama et al. (1990) mostraram, através da análise em M.E.V. e M.E.T., respectivamente, que os orifícios de muitos túbulos dentinários estavam abertos em áreas hipersensíveis e que uma estrutura membranosa aparecia na parede desses túbulos. Já em dentes não sensíveis, a maioria dos túbulos estava obstruída por cristais romboidais de todos os tamanhos, e as estruturas membranosas não foram observadas. Os resultados mostraram que a hipersensibilidade ocorre em dentes com dentina exposta quando a maioria dos túbulos se apresenta aberta. Os resultados microrradiográficos mostraram que a radiolucidez dos túbulos foi mais alta que a da dentina intertubular nas áreas hipersensíveis. Um material eletrodense que contornava a dentina peritubular internamente foi observado em alguns dos túbulos vazios das áreas hipersensíveis. Já nos espécimes não sensíveis, foi possível observar os túbulos obstruídos por um material altamente radiopaco, aparentemente contínuo com a dentina peritubular. Ou seja, os dentes com LCNC apontaram, além da presença de cristais romboidais em dentes não sensíveis, a presença dessa estrutura eletrodensa, com formato tubular. Em 1996, Yoshiyama et al. realizaram um estudo com o objetivo de determinar se existem diferenças na distribuição dessas estruturas tubulares no interior dos túbulos em dentes hipersensíveis e não sensíveis nas regiões cervicais da dentina radicular. Confirmando os achados anteriormente descritos, as estruturas tubulares foram visualizadas nos dentes hipersensíveis e estavam ausentes nos dentes não sensíveis. Esses achados indicam que essas estruturas em forma de tubo podem atuar como fatores inibidores da obliteração tubular, prevenindo a precipitação fisiológica dos cristais minerais e mantendo a desobstrução e a hipersensibilidade dentinária.

Duke e Lindemuth (1991) submeteram dentes com LCNC à análise em M.E.V. Consistente com os resultados de Yoshiyama et al. (1989), a superfície dentinária de dentes não sensíveis apresentaram grande quantidade de túbulos obliterados, revelando os cristais romboidais. A superfície sensível mostrou túbulos dentinários abertos, sem depósitos minerais. Ainda, na dentina profunda dessas lesões foram observadas, em grande aumento, estruturas tubulares lembrando prolongamentos odontoblásticos calcificados. Isokawa; Kubota; Kuwajima (1973) acreditam que as substâncias inorgânicas são depositadas nos prolongamentos odontoblásticos ou recobrando sua superfície, o que gera esse aspecto tubular às estruturas mineralizadas encontradas abaixo das LCNC.

Azrak (2003) constatou que, de modo geral, os túbulos nas LCNC se apresentaram obstruídos por estruturas mineralizadas de formato tubular, projetando-se para além dos limites das superfícies da dentina. Verificou-se que a presença dessas estruturas variava de

acordo com a região da lesão, com tendência a ocorrerem no ápice da lesão. Tais estruturas se estendiam por todo o comprimento dos túbulos. Já nas lesões artificiais realizadas na face lingual dos mesmos dentes com LCNC, os túbulos encontravam-se invariavelmente amplos e abertos, destituídos das estruturas vistas nas LCNC. Essas estruturas tubulares parecem ser resultados de estímulos diretos sobre a superfície dentinária exposta nas LCNC. Ao que tudo indica, os fenômenos que regem os processos típicos de esclerosamento dentinário são diferentes daqueles que orientam as deposições minerais nessas regiões de lesão cervical. Concordando com Yoshiyama et al. (1996), tem-se a impressão de que essas estruturas encontradas no lúmen dos túbulos podem desempenhar um papel importante no controle da sensibilidade dentinária.

No entanto, Calabria et al. (2008) relataram que não se pode afirmar que a existência dessas estruturas tubulares é ocorrência particular da dentina em LCNC. Aparentemente, as estruturas tubulares ocorrem tanto nas lesões hipersensíveis como naquela não sensível, pois não foram notadas diferenças estruturais entre elas. Tanto a dentina correspondente à região da lesão quanto à da região não lesionada lingual apresentaram conteúdos intratubulares semelhantes, o que sugere que alguma resposta é desencadeada, também, na face lingual desses dentes. Ainda, os autores aludiram que, muitas vezes, devido à recessão gengival, a face lingual fica exposta, mesmo sem a formação de uma LCNC, e que, talvez, apenas a exposição da dentina à cavidade oral já seria suficiente para que um mecanismo de resposta fosse acionado e desse início à formação dessas estruturas tubulares no interior da dentina. Assim como Azrak (2003) observou, algumas estruturas tubulares aparentavam aspecto mais membranoso, outras mais densas, porém ocas, e outras, ainda, com várias estruturas tubulares sobrepostas, lembrando um aspecto de “casca de cebola”. Os autores sugerem que isso, provavelmente, ocorre devido às diferentes idades das LCNC na cavidade bucal, ou seja, lesões mais antigas, densidade das estruturas tubulares maior. Calabria et al. (2008), ainda, puderam observar, analisando em retroespalhamento de elétrons, que essas estruturas tubulares apresentaram uma densidade muito mais clara e brilhante comparada à dentina peritubular circunjacente, ou seja, é uma estrutura mais mineralizada que a dentina peritubular e intertubular. O retroespalhamento de elétrons tem-se mostrado como uma excelente ferramenta para distinguir as diferenças nos níveis de mineralização dos tecidos biológicos (ANGKER, 2004).

Contudo os mecanismos de respostas do complexo dentinopulpar que ocorrem na dentina de dentes que apresentam LCNC são sempre comparados àqueles que ocorrem nas

lesões cariosas, pois morfologicamente discorrendo, existem semelhanças entre as estruturas encontradas em ambos os tipos de patologias. No entanto, as estruturas vistas em dentes com LCNC em alguns estudos, como mencionado acima, não são descritos em dentes afetados pelas lesões cariosas.

Concernente ao processo carioso, a resposta dentinária relacionada às mudanças microestruturais e químicas tem sido extremamente investigada. A desmineralização da dentina causa uma reação patomorfológica ao complexo dentinopulpar devido à cárie. Essas reações são extremamente complexas, resultando em aposição de dentina peritubular, formação de dentina intratubular e aposição de dentina na câmara pulpar (ARNOLD; KONOPKA; GAENGLER, 2001). A dentina cariada é descrita como possuidora de duas camadas principais distintas: a mais externa, chamada dentina infectada, e a mais interna, chamada de dentina afetada. Cada uma delas então é subdividida em diferentes zonas (MARSHALL et al., 1997). As lesões cariosas em dentina profunda, em contraste com as lesões de cárie iniciais, são divididas em seis diferentes zonas: a dentina amolecida, a dentina desmineralizada, a dentina invadida por bactérias, a dentina translúcida formada pelos tratos mortos, a dentina translúcida hipermineralizada e a dentina terciária, esta última formada na borda da câmara pulpar (FURRER, 1922 apud ARNOLD et al., 2003). Existe um consenso de que a dentina imediatamente adjacente à atividade cariosa sofre um aumento no conteúdo mineral comparado com a dentina saudável. Mais impressionante ainda são as mudanças intratubulares observadas nessa zona. (DUKE; LINDEMUTH, 1991). Entretanto a origem, a extensão e o conteúdo químico dessa zona translúcida ainda são incertos (ARNOLD et al., 2003).

A lesão cariosa é detectada pelos odontoblastos, ao progredir através do esmalte, pela rapidez com que o complexo dentinopulpar responde aos estímulos externos. Na sequência, os túbulos dentinários começam a ser obliterados para formar a dentina intratubular (BJØRNDAL; THYLSTRUP (1995), a qual irá reduzir a progressão da cárie quando a lesão alcançar a dentina (BJØRNDAL; MJÖR, 2001). Essa camada de túbulos dentinários ocluídos abaixo da lesão cariosa é chamada de camada transparente ou translúcida, isso porque os depósitos minerais no interior dos túbulos competem com o índice de refração da dentina, dando esse aspecto transparente quando se olha em um microscópio de transmissão de luz (WEBER, 1974).

Sendo assim, muitas tentativas têm sido feitas com o intuito de descrever as estruturas da dentina cariada e também para analisar a composição das diferentes zonas da dentina de lesões cariosas usando microrradiografia ou microanálise com feixes de elétrons (KINNEY et al., 1995; TJÄDERHANE et al., 1995; NGO et al. 1997; BJØRNDAL et al., 1998; KAWASAKI et al., 2000; MARSHALL et al. 2001). Têm sido descritas obstruções dos túbulos dentinários com largos depósitos cristalinos (BRADFORD, 1958; FRANK; VOEGEL, 1980; PASHLEY, 1986). Entretanto pouco se sabe a respeito da ultraestrutura da dentina intratubular induzida pela lesão cariosa, assim como do mecanismo de formação dessa dentina (ZAVGORODNIY et al., 2008). Zavgorodniy et al. (2008), analisando áreas transparentes de dentina cariada, puderam observar dois tipos de cristalitos que formavam a dentina intratubular, um em forma de lâmina e, outro, de agulha. Ainda, os mesmos tipos de cristais foram observados na dentina intertubular. Recentemente foi mostrado que a composição da dentina intratubular é diferente daquela da dentina intertubular (ARNOLD et al., 2001). A maioria dos pesquisadores concorda que a zona translúcida hipermineralizada ocorre devido à secreção de dentina intratubular pelos prolongamentos odontoblásticos como uma reação biológica à agressão à dentina pelos microorganismos cariogênicos (WEBER, 1974; HAWKINSON; EISENMANN, 1983; OGAWA, et al. 1983; VASILADIS, et al. 1983; VERBEECK; BRUYNE, 1989; ARNOLD; KONOPKA; GAENGLER, 2001; ARNOLD et al., 2003). Porém também tem sido debatido que a deposição de dentina intratubular pode ser resultado da reprecipitação da hidroxiapatita dissolvida no processo de desmineralização da dentina (DACULSI et al., 1987); e que a concentração de cálcio no fluido dentinário de dentes afetados pela lesão cariosa é muito maior que a encontrada em dentes sadios, havendo também um aumento muito pequeno na concentração de magnésio (LARMAS, 2001). Controversamente, apesar do fato de os túbulos dentinários serem preenchidos por cristais, Ogawa et al. (1983) mostraram que a camada translúcida não é a região mais mineralizada da dentina cariada, e sim a mais amolecida. Arnold et al. (2003) concordam com os estudos acima, de que a zona translúcida não é completamente mineralizada, o que reflete o alto conteúdo de carbono encontrado nessa zona e que, portanto, a mineralização intratubular não pode prevenir completamente futuras invasões bacterianas ou difusão de agentes químicos, como o adesivo, no interior dos túbulos dentinários e, do mesmo modo, a polpa. Também se observou que a extensão da zona translúcida independe da extensão da zona de desmineralização. Isso significa que se a zona translúcida se formasse pelo processo de reprecipitação dos produtos, ela deveria apresentar a mesma extensão da zona de

desmineralização. Portanto, parece que a estabilização na extensão da zona translúcida se deve a um limite das respostas dos prolongamentos odontoblásticos às agressões.

Frank; Voegel (1980) analisaram, em M.E.T., a zona transparente da dentina com lesão cariosa. Os autores notaram 3 tipos de calcificação intratubular. Na primeira, no espaço periodontoblástico, os depósitos minerais entrelaçavam-se às fibrilas de colágeno ou as fibrilas mostravam-se mineralizadas. Quando esse espaço estava completamente calcificado, era possível observar o prolongamento odontoblástico passando pelo estreito lúmen dos túbulos. O segundo tipo de dentina esclerótica observada foi aquele onde o prolongamento odontoblástico se apresentou calcificado por um material granular bem fino ou por depósito denso e homogêneo. O terceiro tipo foi notado na ausência dos prolongamentos odontoblásticos onde se visualizou uma variedade de depósitos minerais no interior dos túbulos e circundando suas paredes. Sendo assim, os prolongamentos não degeneraram antes do esclerosamento e, também, não retraíram durante a mineralização do espaço periodontoblástico, ficando cercados por cristais.

Esses cristais têm-se mostrado capazes de ocluir completamente os túbulos dentinários da dentina de lesão cariosa, sendo gradualmente depositados imediatamente após a progressão da lesão. Sugere-se que ele é a reprecipitação da apatita dissolvida na dentina (DACULSI et al., 1987). Entretanto, segundo Verbeeck; Bruyne (1989), é improvável que os túbulos dentinários, diante do processo de desmineralização, tenham sido ocluídos pela reprecipitação mineral e que, na verdade, quem contribui para a mineralização intratubular são os prolongamentos odontoblásticos sobreviventes.

As lesões cariosas próximas à raiz são predominantes em pacientes mais velhos e diferem, em progressão e micromorfologia, das lesões na dentina coronária. Embora existam semelhanças entre a dentina coronária cariada e as lesões cariosas cervicais, algumas diferenças em sua histomorfologia guiam a diferentes conclusões sobre como conduzir as terapias nessa região (ARNOLD et al., 2007).

A extraordinária variação da estrutura e composição dentinária reflete as diferenças de comportamento dos materiais restauradores ao substrato dentinário, principalmente os sistemas adesivos (PASHLEY et al., 2002). Sabe-se que os cristais romboidais localizados na dentina esclerótica, responsáveis pela obliteração total ou parcial dos túbulos (GWINNET; JANDRESEN, 1978; ISOKAWA; KUBOTA; KUWAJIMA, 1973; WANG; SPENCER; WALKER, 2007), geram problemas na adesão, porque esses cristais são resistentes ao

condicionamento com ácido fosfórico, prejudicando ou mesmo impedindo a formação dos *tags* de resina. Ainda, a zona de interdifusão entre resina/dentina (camada híbrida) formada no substrato dentinário é muito mais delgada e irregular comparada àquela da dentina normal, possivelmente devido à hipermineralização dos tecidos que remanescem sobre a superfície após o condicionamento ácido (MEERBEEK et al., 1994; KWONG et al., 2000; LOPES et al., 2004). Yoshiyama et al. (1996) ressaltaram que a eficácia dos sistemas adesivos é reduzida em dentes com LCNC devido à dificuldade de se condicionar o substrato dentinário nesses casos.

Pashley et al. (2002) procuraram testar a hipótese de que a zona transparente afetada pela lesão cariosa é condicionada diferentemente da dentina normal. Nesse estudo, a dentina peritubular e intertubular, tanto da dentina normal como da dentina afetada pela lesão cariosa, exibiram comportamento similar. A maior característica distinguível da dentina cariada transparente foi a presença de depósitos minerais ácido-resistente no interior dos lumens tubulares. A presença desses depósitos parece não ter influenciado na desmineralização das diferentes regiões dentinárias. Sakoolnamarka et al. (2004) encontraram diferenças na aparência da dentina esclerótica condicionada quando comparada com a dentina normal de lesões não cariosas. Nas regiões de esclerose, a dentina intertubular estava saturada por cristais e com pouca exposição da rede de fibrilas de colágeno onde o adesivo deveria penetrar. Apesar de a capacidade de desmineralização do agente condicionante não ser um fator importante para se obter boa adesão na dentina normal, parece ser, sim, importante em dentes com LCNC (LOPES et al., 2004). Meerbeek et al. (1994) puderam observar que, além da camada híbrida delgada e dos *tags* de resina bem mais curtos, a superfície dentinária esclerótica das lesões não cariosas tratada com ácido cítrico mostrou áreas completamente hipermineralizadas, sem expor a embocadura dos túbulos, variando com áreas que mostravam abundantes bastões de esclerose que se estendiam além dos túbulos dentinários. Os autores concluíram que a dentina esclerótica de lesões não cariosas é substancialmente diferente daquela dentina não afetada, e que, portanto, a técnica de adesão para esse tipo de dente deve ser repensada.

Avaliando dentes com LCNC, Marshall et al. (2000) puderam notar que os depósitos cristalinos, que ocluíam a maioria dos túbulos dentinários, desmineralizaram mais lentamente que os outros componentes da dentina, assim como a dentina intertubular pareceu ser mais ácido-resistente quando comparada à dentina normal. Isso indica que a dentina esclerótica está associada não somente aos depósitos cristalinos no interior dos túbulos, mas às alterações na

dentina intertubular. O mesmo tipo de estudo foi realizado por Marshall et al. (2001) para observar a resposta ao condicionamento ácido da dentina esclerótica de lesão cariosa, comparada à dentina normal. A única diferença observada, entretanto, foi a presença dos depósitos minerais no interior dos túbulos dentinários. Diferentemente dos achados nos dentes com LCNC, a desmineralização da dentina peritubular e intertubular dos dentes com lesão cariosa foi semelhante a dos dentes sem lesão. Ainda, os depósitos minerais pareceram se soltar do lúmen tubular, depois do condicionamento ácido pelo tempo de 20 segundos, provavelmente devido à desmineralização da dentina adjacente.

Em um estudo comparando adesão em dentina hígida coronária e radicular e afetada pela lesão cariosa, Yoshiyama et al. (2004), puderam notar que mesmo sendo dentina normal, a força adesiva na região radicular foi menor quando comparada com a região coronária. Na região radicular afetada pela lesão cariosa, ou seja, na dentina esclerótica, a adesão foi ainda mais baixa.

Dessa forma, pode-se notar que a dentina é um substrato dinâmico sujeito a contínuas alterações pelos processos patológicos e fisiológicos, as quais modificam a composição de sua microestrutura. Em relação à esclerose dentinária fisiológica, o complexo dentinopulpar é capaz de desenvolver mecanismos específicos contra as injúrias externas. Consequentemente, a dentina encontrada nas diversas situações clínicas pode ser bem diferente daquela dentina inalterada (STANLEY et al., 1983). Se a formação da dentina intratubular é um processo regulador fisiológico ou puramente o resultado de um mecanismo físico-químico, ainda permanece desconhecido (ARNOLD; KONOPKA; GAENGLER, 2001). A dentina, suas propriedades e características são chaves determinantes de quase todos os procedimentos restauradores, processo carioso, desenvolvimento, progressão de lesões cervicais e na terapia preventiva e restauradora de dor e sensibilidade dentinária. É importante notar que as características da dentina apresentam influência em muitos outros aspectos da prática dental (MARSHALL JR., 1993).

A exata composição do fluido dentinário é incerta e a relação entre prolongamentos e fibrilas nervosas não está clara. Apesar do significativo progresso na área de mineralização dentinária, ainda constituem grande necessidade um melhor entendimento desse mecanismo complexo envolvendo a deposição inicial e adicional dos cristais de hidroxiapatita, bem como a íntima relação da apatita e as proteínas colagenosas e não colagenosas, componentes lipídicos e carboidratos.

2.3 COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ELEMENTAL DA DENTINA

O fosfato de cálcio (Ca-P) é de especial interesse da biologia oral devido a sua ocorrência em calcificações normais (esmalte, dentina, cemento e osso) e patológicas (cálculo dentário e pedras salivares). Ele também está associado à formação, progressão e controle do desenvolvimento da lesão cariiosa em esmalte e dentina (LeGeros, 1991). Ele foi identificado como estrutura de apatita em 1926, usando-se um dispersor de raios-X. Muitos tipos de Ca-P como o ACP, DCPD, OCP e β -TCP têm sido especulados como sendo os precursores da apatita biológica nas calcificações. Além disso, nas calcificações patológicas, muitas fases do Ca-P estão normalmente presentes de maneira simultânea. Por exemplo, o β -TCP ou $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ puro não é encontrado no sistema biológico, mas o β -TCP Mg-substituto ocorre nas calcificações patológicas, como no cálculo dental (LeGeros, 1991).

O fosfato de cálcio pode ser encontrado da seguinte maneira, como na **Tabela 1** abaixo:

Tabela 1: Ca-P no sistema biológico em humanos. Adaptado LeGEROS (1991).

Fosfato de cálcio	Fórmula química	Ocorrências
Apatita	$(\text{Ca,Z})_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH,X})_2$	esmalte ^a , dentina ^a , osso ^a , cálculo dentário, calcificação de tecidos moles
Fosfato octacálcio (OCP)	$\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	cálculo dentário
Fosfato dicálcio diidratado (DCPD)	$\text{CaOHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	cálculo dentário, decomposição óssea
Whitlockite ou Fosfato tricálcio (β -TCP)	$(\text{Ca,Mg})_9(\text{PO}_4)_6$	cálculo dentário, cálculo salivares, cárie dentária, calcificação de tecidos moles
Fosfato de Cálcio Amorfo (ACP)	$(\text{Ca,Mg})_7(\text{PO}_4\text{Y}')_7$	calcificação de tecidos moles
Pirofosfato de cálcio diidratado (CPPD)	$\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	não reportado no sistema biológico oral

^aZ= Na, Mg, K, Sr, etc.; Y= CO_3 , HPO_4 ; X= Cl, F; Y'= P_2O_7 , CO_3

No entanto, apesar da disponibilidade de sofisticadas técnicas para a análise direta das fases minerais das estruturas dentárias e ósseas (difração de raios-X e nêutrons, ressonância magnética nuclear, microscopia eletrônica de transmissão de alta resolução, etc...), a composição exata e suas estruturas continuam não solucionadas (LeGeros, 1991).

Sabe-se que as diferenças na composição e nas propriedades dos cristais de Ca-P causam diferenças em suas solubilidades. Em condições de grande supersaturação, a proporção molar de Ca/P inicial não apresenta efeito significativo no tipo de composto Ca-P formado. Entretanto, em condições de pouca supersaturação, essa proporção gera influência.

O efeito do pH/temperatura é o mais dominante no sentido de influenciar a formação dos tipos de compostos Ca-P. Contudo, o efeito do pH/temperatura é modificado pela presença de outros íons. Por exemplo, o Mg permite a formação de DCPD mesmo em alto pH, favorecendo a formação de outras fases de Ca-P e promove a formação de ACP contendo Mg. O flúor permite a formação da apatita na razão de DCPD, OCP ou β -TCP Mg-substituto. A incorporação de Mg aumenta simultaneamente à de F e CO_3 . (LeGeros, 1991).

Nos tecidos duros dentários, o processo de mineralização vem sendo estudado há décadas, mas a análise quantitativa molecular das formações minerais não foi, ainda, completamente entendida. Tem-se postulado que a mineralização da dentina é modulada por moléculas de proteínas e microestruturas derivadas de células como, por exemplo, vesículas e debris teciduais (ARANA-CHAVES; MASSA, 2004). Também tem sido demonstrado que a mineralização da dentina intertubular periférica é induzida pela matriz extracelular, que contém componentes colagênicos e não colagênicos tais como: colágeno tipo I, proteínas fosforiladas, sialoproteínas da dentina não fosforiladas, proteoglicanas, proteína – GLA e fosfolipídios. Em contrapartida, tem-se mostrado que a formação da dentina peritubular deve-se somente à matriz extracelular, que contém apenas componentes não colagênicos como as glicoproteínas, proteoglicanas, lipídios e proteínas serosas (GOLDBERG et al., 1995). Menos ainda se sabe a respeito da ultraestrutura da dentina intratubular induzida pela lesão cariosa e o mecanismo de ação durante a sua formação (DACULSI et al., 1987).

A natureza mais calcificada da dentina peritubular, comparada à dentina intertubular, já foi demonstrada pelo uso de diferentes métodos. Utilizando microscópio de íons secundário, Lefèvre et al. (1976) confirmaram o alto conteúdo de cálcio e fósforo na dentina peritubular e, também, de magnésio. Algumas vezes puderam notar alto conteúdo de potássio e sódio. Através do método de difração de elétrons em áreas selecionadas, além da hidroxiapatita puderam notar a presença da estrutura de *whitlockite*. Com base nesses achados, estimou-se que 1% do Mg, em peso, foi incorporado na estrutura de *whitlockite* da dentina peritubular. Os autores também analisaram as regiões de esclerose dos túbulos dentinários e não puderam diferenciar seu conteúdo ao da dentina peritubular. Em 1985, Schroeder e Frank concluíram, utilizando microscópio de transmissão e difração de elétrons, que os cristais encontrados na dentina peritubular são de hidroxiapatita e que, ainda, outros estudos devem ser realizados para se ter certeza da presença de outros tipos de cristais nessa estrutura.

Analizando dentes cariados, Frank, Voegel (1980) detectaram 4 tipos diferentes de cristais no interior dos túbulos dentinários, utilizando MET e EDX. O padrão de difração dos cristais encontrados nos espaços periodontoblásticos e na fase inicial de formação foi semelhante aos de *whitlockite*. Com o avanço da mineralização, foram detectados cristais de hidroxiapatita juntamente com os cristais de *whitlockite*, confirmando os achados de Lefèvre et al. (1976).

Aparentemente, a dentina afetada pela cárie apresenta depósitos de β -tricálcio fosfato (β -TCP) – *whitlockite* - nos túbulos dentinários (DACULSI et al., 1987; DUKE; LINDEMUTH, 1991). Comparando o mineral residual após o condicionamento ácido, confirmou-se a presença de depósitos de TCP ácido-resistentes, pois estes cristais são menos solúveis que os de hidroxiapatita em pH menor que 5.5, devendo prevenir, dessa forma, uma rápida desmineralização (FRANK; VOEGEL, 1980; VERBEECK; de BRUYNE, 1989). O magnésio tem-se mostrado um íon estável na mineralização do β -TCP Mg-*whitlockite*. Isso indica que, no sistema biológico, o Mg parece estabilizar a estrutura de *whitlockite* (LeGeros, 1991). Em contrapartida, Zavgorodniy et al. (2008) observaram que os elementos químicos encontrados nos cristais em forma de agulha da dentina intratubular eram semelhantes aos da apatita biológica, enquanto que os cristais em forma de lâmina não eram apatita. Os espectros de raios-X mostraram, além de Ca e P, traços bem evidentes de Mg e Si e um pouco de Cl. Entretanto, a quantidade de cristais de β -TCP na dentina intratubular foi muito pequena. A natureza policristalina dos cristais de β -TCP Mg-substituto sugerem que a formação desse mineral se deve ao mecanismo de dissolução da dentina intertubular seguido da precipitação do mesmo cristal no interior dos túbulos em condições ácidas e na presença de Mg. Os autores ainda citam que o *whitlockite* é muito mais solúvel que a apatita e que, portanto, esse tipo de cristal de fosfato de cálcio é menos resistente que a apatita diante do desafio cariioso.

Arnold; Konopka; Gaengler (2001), analisando diferentes áreas de dentes cariados, concluíram que a mineralização da dentina intratubular difere da dentina normal e que essa mineralização não é hidroxiapatita pura. Isso porque a razão Ca/P na dentina normal (2.1), dentina desmineralizada (1.9), dentina peritubular (2.0) e dentina terciária (1.9) foi próxima ao da hidroxiapatita (1.8), enquanto que na dentina intratubular (1.3) foi diferente. O conteúdo de Mg foi significantemente diferente entre a dentina normal e a dentina terciária. A maior concentração de Mg foi encontrada na dentina peritubular. Notou-se maior quantidade de Mg na dentina intratubular comparado aos outros tipos de dentina o que, segundo os autores, suporta a hipótese de que o Mg está envolvido nos processo de biomineralização.

Utilizando espectroscopia Raman, Wang, Spencer, Walker (2007) demonstraram que o conteúdo de Ca e P diminuem em regiões afetadas pela lesão cáries quando comparado às regiões não afetadas. Também puderam notar que a composição mineral da apatita é diferente devido ao ciclo de desmineralização e remineralização. Os picos de carbono (1070 cm^{-1}) diminuíram drasticamente na dentina afetada pela lesão cáries, indicando que este elemento é facilmente removido pelo processo cáries. A estrutura de colágeno, mais especificamente as regiões de amina I e III, apareceu, também, levemente alterada. Os autores confirmaram que a maioria do mineral residual é composta por depósitos de TCP ácido-resistente. Esses depósitos minerais restringem o acesso do ácido à dentina, alterando, portanto, o processo de desmineralização.

Traços de Mg estão sempre presentes no fluido dentinário (LARMAS, 2001) e podem ser incorporados à estrutura da hidroxiapatita (Mg substituindo o Ca). O Mg é isoelétrico com o Ca e não causa nenhuma diferença de carga com relação à posição cristalográfica. Os cristais da dentina intratubular em formato de lâmina, abaixo da lesão cáries, apresentaram não somente uma porcentagem um pouco maior de Mg, mas a proporção de Ca/P foi muito menor quando comparada com a hidroxiapatita pura (1.67), mostrando a natureza diferente entre esses cristais e daqueles com formato de agulha que possuem componentes semelhantes aos da apatita (ZAVGORODNIY et al., 2008). O maior constituinte inorgânico presente na dentina é o cálcio, seguido do fósforo e, em menores concentrações, carbonato, sódio e magnésio, nessa ordem, sendo a razão cálcio-fósforo de 1.57 (DRIESSENS; VERBEECK, 1990 apud MARSHALL JR., 1993). Segundo Gaengler (1995) apud Arnold et al. (2003), a variedade na proporção Ca/P é diferente entre os tecidos biomineralizados e, na dentina, essa variação vai de 1.7 a 2.4. Ainda, segundo Driessen, Verbeek (1990), a média encontrada na literatura para a proporção Ca/P é de 1.97.

Daculsi et al. (1987) realizaram um estudo com o propósito de explicar a presença dos cristais de *whitlockite* (β -TCP Mg-substituto) em cáries paralisadas, *in vitro*, em M.E.T. Foram, também, selecionados dentes que apresentavam lesão cáries dentinária. O β -TCP Mg-substituto foi obtido por um método de precipitação de soluções com Mg/Ca, na razão de 5/95. Tais correlações guiam a proposta de uma possível sequência cronológica dos eventos físico-químicos que ocorrem no cristal durante o progresso e paralisação da lesão cáries na dentina. Foram observados, nos dentes cariados, túbulos completamente obstruídos por densos cristais muito maiores que aqueles vistos na dentina peritubular. Os autores sugeriram que o mecanismo inicial para o acontecimento observado dos largos cristais de *whitlockite* e

de apatita no lúmen tubular deve-se à dissolução da dentina mineral (CO_3^- e Mg ricos em apatita) e reprecipitação em β -TCP Mg-substituto (CO_3^- e Mg pobres em apatita).

Arnold et al. (2003) analisaram quimicamente regiões da dentina com lesão cariosa profunda com EDX. O conteúdo de Ca, P e C mostraram ser significativamente diferentes entre todas as zonas analisadas. A menor quantidade de Ca e P foi encontrada na dentina desmineralizada. A proporção Ca/P foi estatisticamente diferente entre a dentina sadia e a desmineralizada. Concluiu-se, dessa maneira, que o conteúdo mineral da dentina intertubular da zona translúcida e desmineralizada é diferente daquele da dentina sadia, e que o padrão de mineralização da zona translúcida se deve às respostas biológicas diante da lesão cariosa. Em dentes envelhecidos, entretanto, não se evidenciou a presença de β -TCP Mg-substituto na dentina intratubular, e que a maioria dos minerais intratubulares da dentina transparente, nesses dentes, é de fato apatita (PORTER et al., 2005).

Mixson et al. (1995) realizaram um estudo com o propósito de caracterizar morfológicamente e quimicamente *in vivo* as lesões cervicais de erosão e abrasão. Os resultados mostraram os túbulos abertos na porção mais profunda da dentina. A razão mineral/proteína da dentina esclerótica sugeriu um aumento no conteúdo mineral da amostra de dentina.

Yoshiyama et al. (1996) utilizaram o EDS com o objetivo de quantificar a composição dos materiais intratubulares, ou seja, cristais e as estruturas tubulares encontrados em dentes com e sem hipersensibilidade dentinária, respectivamente. S, P e Ca foram detectadas em maior quantidade nas estruturas tubulares, sendo $\text{S/P} = 2.29$ e $\text{Ca/P} = 0.76$. Na dentina peritubular foram detectados apenas Ca e P na proporção de 1.52.

Dessa forma, nota-se que o conhecimento das variações morfológicas e composicionais da dentina, ao longo da permanência do dente na boca, é de importância fundamental para o correto julgamento das respostas do complexo dentinopulpar e dos procedimentos que serão realizados nos dentes, seja do ponto de vista puramente biológico ou biomecânico. Um dos problemas comuns durante as manobras restauradoras é exatamente a grande variabilidade do substrato dentinário, dependendo da região do dente em que se atua, da profundidade das cavidades ou de lesões, da idade do paciente e do tipo de estímulo que o dente já recebeu enquanto na cavidade oral (PEREIRA, 2004). Nota-se, entretanto, que persistem dúvidas quanto às características da dentina quando influenciadas pela idade do dente, pelo processo carioso ou pela exposição dentinária não patológica (LCNC), já que,

aparentemente, esses fatores conferem diferentes reações do complexo dentinopulpar. Dessa forma, a morfologia, o conteúdo dentinário e a composição das estruturas continuam sendo fontes de interesse e discussão para muitos pesquisadores, pois muitas dúvidas persistem em torno dessa tão complexa estrutura dentária.

3 Proposição

3 PROPOSIÇÃO

O presente trabalho teve como objetivo geral analisar qualitativa e semiquantitativamente, em Microscópio Eletrônico de Varredura (M.E.V.) - Técnica Convencional e por Retroespalhamento de Elétrons (BSE) - e por Espectroscopia de Dispersão de Raios-X (E.D.S.) a microestrutura dentinária de dentes nas seguintes condições clínicas:

- Inclusos jovens (IJ);
- Hígidos jovens (HJ);
- Hígidos adultos (HA);
- Com lesão cariiosa oclusal (LCO);
- Com lesão cariiosa cervical (LCC);
- Com exposição radicular (ER) e
- Com lesão cervical não cariiosa (LCNC).

Tiveram-se como objetivos específicos:

1. Comparar a conformação microestrutural nos diferentes tipos de dentina cervical e oclusal obtidos;
 2. Avaliar a composição química e a proporção dos elementos químicos nas diferentes dentinas;
 3. Observar se a microestrutura dentinária da região cervical vestibular e a microestrutura da dentina na região lingual oposta era a mesma;
 4. Analisar se os depósitos minerais eventualmente encontrados no interior dos túbulos apresentam a mesma conformação estrutural e natureza química.
-

4 Material e Métodos

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 OBTENÇÃO DOS DENTES

Para a realização deste estudo, foram utilizados dentes extraídos nos ambulatórios da Faculdade de Odontologia de Bauru – USP. Os dentes foram obtidos independentemente do grupo dentário, mediante a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da mesma Faculdade (processo nº 183/2009) (**Anexo C**), depois de assinados os Termos de Doação pelos pacientes (**Anexo A**) ou pelos cirurgiões-dentistas (**Anexo B**). Foram selecionados dentes inclusos jovens (IJ), hígidos jovens (HJ), hígidos adultos (HA), com lesão cariosa oclusal (LCO), com lesão cariosa cervical (LCC), com lesão cervical não cariosa (LCNC) e com exposição radicular sem lesão (ER), como esquematizado na **Figura 1**. Todos os dentes estavam previamente indicados para a extração por motivos ortodônticos, protéticos ou terapêuticos.

No momento das extrações todo o cuidado foi tomado para que o fórceps ou extrator não entrasse em contato direto com a superfície das lesões (LCNC, LCC e LCO) e da exposição radicular, evitando alterações morfológicas por esmagamento, fraturas ou trincas nessas áreas dos dentes. Para os dentes IJ, HJ e HA, apenas cuidados para não remover ou fraturar esmalte e dentina na região cervical, que seriam posteriormente analisados em microscópio de varredura.

Previamente às extrações, realizou-se um exame clínico detalhado dos dentes e das condições dos pacientes, anotando-se as seguintes informações:

1. Idade do paciente
2. Sexo
3. Ausência de exposição pulpar. Nos grupos LCC e LC foram selecionados dentes que permitissem a análise da dentina remanescente abaixo dessas lesões.
4. Ocorrência de hipersensibilidade dentinária nos dentes com LCNC e com ER.

Para o teste hipersensibilidade dentinária foram utilizados jato de ar e raspagem das superfícies com sonda exploradora (ABSI *et al.*, 1987; RIMONDINI; BARONI; CARRASI, 1995; COLEMAN; GRIPPO; KINDERKNECHT, 2000). Essa informação foi obtida com a finalidade de permitir eventuais associações entre as características microestruturais da dentina e sua condição clínica.

Nos dentes com LCC e LCO avaliou-se a condição pulpar por meio de radiografias preexistentes nas fichas dos pacientes e da anamnese do paciente com base na estratégia de diagnóstico, sugerida por Pereira et al. (2004), pois dentes com envolvimento pulpar foram descartados.

Figura 1 – Modelo esquemático das características exigidas para a obtenção dos dentes a serem estudados. A – Dente hígido jovem ou incluso; B – Dente hígido adulto; C - Dente com lesão cariosa oclusal; D – Dente com lesão cervical não cariosa; E – Dente com lesão cariosa cervical; F – Dente com exposição radicular.

4.2 CONSTITUIÇÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS

Neste estudo foram utilizados 35 dentes vitais compondo 7 grupos com $n=5$ para cada grupo, definidos a seguir. Todos os grupos foram minuciosamente escolhidos, tentando-se isolar as alterações clínicas elegidas para esta pesquisa.

Grupo I - dente incluso (IJ).

Os dentes inclusos foram obtidos de pacientes jovens, com idade igual ou menor que 18 anos. Para esta pesquisa, considerou-se como dente incluso aqueles não irrompidos e totalmente protegidos por tecido ósseo ou por tecido gengival.

Grupo II – dente hígido jovem (HJ).

Os dentes HJ foram obtidos de pacientes com idade média de 22,6 anos. Eram dentes já irrompidos na cavidade bucal e que sofreram apenas estímulos físico-mecânicos, não apresentando sinais clínicos de desgastes, trincas ou lesões cariosas incipientes.

Grupo III – dente hígido adulto (HA).

Os dentes HA foram obtidos de pacientes com idade superior a 60 anos. Apesar de presentes por longo tempo na boca e expostos à ação de estímulos físicos e mecânicos, esses dentes não apresentavam, sob detalhado exame clínico, alterações patológicas.

Grupo IV – dente com lesão cariiosa oclusal (LCO).

A idade média dos pacientes possuidores de dentes com LCO foi de 34 anos. Apresentavam lesões cariosas ativas, com diferentes profundidades, mas, ainda assim, distantes da polpa dental.

Grupo V – dente com lesão cariiosa cervical (LCC).

O grupo dos dentes com LCC foi de pacientes com uma média etária de 57 anos. Apresentavam lesões bem típicas àquelas chamadas de “cárie de raiz”, com dentina de aspecto endurecido logo abaixo da superfície. Após a remoção do conteúdo superficial com a colher de dentina, evidenciava-se uma dentina com aparência esclerosada. Todas as LCCs apresentaram-se clinicamente extensas, tanto no sentido gengivo-oclusal/incisal, como vestibulo-pulpar, alcançando o terço médio da dentina.

Grupo VI – dente com exposição radicular (ER).

Os dentes com ER foram obtidos de pacientes com idade média de 42,4 anos. Desses dentes, 3 apresentaram-se sensíveis e 2 dentes não sensíveis ao jato de ar e à sondagem. Todos os dentes apresentaram exposição na superfície vestibular devido à recessão gengival por perda óssea. A superfície dentinária exposta apresentava como característica clínica um aspecto brilhante e polido, porém sem desgaste dentário evidente.

Grupo VII – dente com lesão cervical não cariiosa (LCNC).

Os dentes obtidos neste grupo provieram de pacientes com idade acima de 70 anos, sendo apenas 1 dente de paciente com 57 anos. Dos dentes deste grupo, dois apresentaram

ligeira hipersensibilidade, enquanto os demais não acusaram hipersensibilidade. As lesões eram bem nítidas, quatro delas apresentando formato de pires raso e uma com formato de cunha.

Abaixo segue a **Tabela 2** detalhando os grupos experimentais, os grupos dentais, a idade dos pacientes, o sexo e, no caso dos dentes com LCNC e ER, a presença ou ausência de HD.

Tabela 2 – Agrupamento dos dentes considerando a identificação e as características clínicas.

	Dente	Idade	Sexo	HD
IJ	Molar (28)	18	feminino	-
	Molar (18)	18	feminino	-
	Molar (38)	16	feminino	-
	Molar (48)	18	feminino	-
	Molar (28)	18	masculino	-
HJ	Molar (18)	23	masculino	-
	Molar (48)	22	feminino	-
	Molar (48)	23	masculino	-
	Molar (18)	22	feminino	-
	Molar (48)	23	feminino	-
HA	Incisivo lateral (32)	71	masculino	-
	Molar (18)	43	feminino	-
	Incisivo inferior (31)	71	masculino	-
	Incisivo inferior (41)	71	masculino	-
	Molar (17)	63	masculino	-
LCO	Molar (48)	23	masculino	-
	Molar (18)	32	feminino	-
	Molar (18)	48	masculino	-
	Molar (28)	24	feminino	-
	Molar (28)	43	feminino	-
LCC	Incisivo Lateral (22)	55	masculino	-
	Central (23)	63	masculino	-
	Molar (47)	47	masculino	-
	Molar (26)	60	masculino	-
	Canino (23)	60	masculino	-
ER	Molar (26)	41	masculino	Pouco sensível
	Molar (18)	41	masculino	Pouco sensível
	Molar (38)	48	masculino	Não sensível
	Pré-molar (14)	34	masculino	Sensível
	Molar (17)	48	masculino	Não sensível
LCNC	Canino (13)	57	masculino	Pouco Sensível
	Molar	79	masculino	Não sensível
	Incisivo lateral (42)	71	masculino	Não sensível
	Incisivo inferior (31)	75	masculino	Pouco sensível
	Incisivo inferior (32)	75	masculino	Pouco sensível

4.3 ARMAZENAGEM E PREPARAÇÃO DOS ESPÉCIMES

Imediatamente após a extração, os dentes foram limpos com gaze umedecida em solução fisiológica, removendo-se resíduos teciduais e sangue. Em seguida, todos os dentes foram armazenados em solução Karnovsky (solução fixadora composta de glutaraldeído a 2,5% e paraformaldeído a 2,0%, em 0,1M tampão cacodilato, pH 7.0), sob temperatura de 4°C. A identificação dos dentes foi feita no próprio recipiente de armazenagem, anotando-se o nome do paciente, a idade, o número do dente e sua condição clínica.

Na sequência, os dentes foram montados em suportes de resina acrílica, fixados por uma de suas faces proximais, com cera pegajosa (Asfer Indústria Química Ltda.). Os dentes foram seccionados transversalmente aos seus longos eixos, removendo-se parte da raiz e da coroa com um disco diamantado (Exttec Corp - 102mm X 0.3mm X 12.7mm, Enfield/USA) na máquina de corte de precisão (ISOMET 1000 - Exttec Corporation, Labcut 1010, USA), sob refrigeração abundante, preservando somente os terços cervicais dos dentes IJ, HJ, HA, LCC, LCNC e ER e da região abaixo da lesão dos dentes com LCO. Sendo assim, para a obtenção dos segmentos dentinários, as cúspides foram seccionadas removendo-se grande parte do esmalte oclusal até a exposição da dentina, e as raízes, 2-3 mm abaixo da junção cemento-esmalte (JCE). Para os dentes com LCC, LCNC e ER, a secção se deu 2-3 mm abaixo da margem cervical da lesão/exposição radicular (Fig. 2).

Figura 2 – Cortes representativos dos dentes. A- Corte dos dentes IJ, HJ, HA 2-3mm abaixo da JCE e do esmalte oclusal, preservando-se o terço cervical. B- Corte dos dentes com LCC, LCNC e ER 2-3mm abaixo da margem cervical da lesão/exposição radicular e das cúspides, removendo-se todo o esmalte oclusal até a exposição da dentina. C- Corte dos dentes com LCO 2-3mm abaixo da JCE e removendo o esmalte oclusal, preservando a dentina reacional/esclerótica logo abaixo da lesão cáries.

Após a obtenção dos segmentos dentários correspondentes ao terço cervical, os dentes foram fixados com cera pegajosa, pela superfície radicular, com o objetivo de planificar as

faces proximais para, numa etapa posterior, facilitar a colagem dos espécimes nos *stubs* metálicos e permitir a análise em M.E.V. no plano mais favorável da lesão (**Fig. 3**).

Figura 3 – Fixação do segmento dentário cervical pela base radicular e secção das faces proximais, paralelas uma a outra, para a planificação das superfícies.

Nos dentes com LCO e com LCC, a dentina cariada amolecida foi removida com o auxílio de colheres de dentina (Duflex), resistente à remoção com cureta de tamanho compatível com a lesão, até a visualização de uma dentina escura e endurecida, pois o foco da análise nesses dois grupos era a região dentinária remanescente imediatamente abaixo da lesão cariada (**Fig. 4**).

Figura 4 – Remoção do tecido cariado amolecido com colher de dentina em dente com LCO. O mesmo procedimento foi realizado em dentes com LCC.

Em seguida, todos os dentes foram fraturados longitudinalmente, no sentido vestibulo-lingual. Para isso, exceto nos dentes com LCO, foram feitas canaletas nas faces oclusais e radiculares dos segmentos dentários, com pontas diamantadas, em alta rotação, sob abundante refrigeração, mantendo intactas as faces vestibulares e linguais, com o intuito de facilitar e orientar o sentido da fratura. Nos dentes com LCO, as canaletas foram realizadas igualmente aos outros grupos, nas faces radiculares, e na superfície oclusal, apenas nas regiões não comprometidas pela lesão cariada. A profundidade das canaletas limitava-se à metade do

diâmetro da ponta diamantada, visando à preservação das regiões a serem analisadas. Usando as canaletas como guia, os fragmentos dentários foram clivados com o auxílio de uma lâmina metálica percutida com um martelo, com força suficiente para ocasionar a fratura do espécime em duas metades, uma mesial e outra distal, ambas contendo parte da lesão (LCC, LCO, LCNC e ER) ou das superfícies a serem estudadas (IJ, HJ, HA) (**Fig. 5**). Evitou-se o uso de disco de corte para manter o máximo da integridade das estruturas dentinárias e a visualização da relação entre elas, sem a formação *de smear layer* e posterior ação de ácidos para limpeza da superfície. Os espécimes fraturados foram, então, corretamente identificados para reconhecimento dos segmentos mesial e distal, ambos contendo as faces vestibular e lingual, como mostra a **Figura 5D**. Assim, constituíram-se dois grupos, ambos com 35 hemissecções, o primeiro com espécimes a serem preparados para análise em M.E.V. e, o segundo, para a análise em E.D.S. e BSE, totalizando 70 espécimes estudados.

Figura 5 – A e B - Confecção das canaletas nas faces oclusal e radicular com ponta diamantada – espessura de metade do diâmetro da broca, no sentido do longo eixo do dente. C – Posicionamento da lâmina confeccionada para direcionar a força de fratura no longo eixo. D – Fratura do segmento ao meio, originando dois espécimes correspondentes às faces mesiais e distais, contendo ambas as faces vestibulares e linguais.

4.4 PREPARO DOS ESPÉCIMES PARA ANÁLISE EM MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (M.E.V.), ESPECTROSCOPIA POR DISPERSÃO DE RAIOS-X (E.D.S.) E RETROESPALHAMENTO DE ELÉTRONS (BACKSCATTERED ELECTRONS - BSE).

Após as fraturas, os espécimes foram submetidos ao processo de desidratação por imersão em série ascendente de solução de etanol a 50, 60, 70, 80, 90 e 100%, por 1 hora em cada banho.

Em seguida todos os espécimes, devidamente identificados, foram colocados em gaiolas específicas com furos para a penetração do CO₂ líquido, e secados em aparelho de ponto crítico (Critical Point Drying – CPD 030 – Balzers) (**Fig. 6**). Foram realizados 6 banhos de CO₂ líquido para remoção do etanol e, posteriormente, a penetração CO₂ em forma gasosa. Para ocorrer essa troca, a pressão interna da câmara e a saída de gás de CO₂ devem ser controladas e concomitantes para que não ocorra a contração das estruturas internas da dentina. Posteriormente, os espécimes foram fixados com fitas adesivas de carbono dupla face (Koch Instrum Cient – São Paulo - SP), em *stubs* metálicos. Na base dos *stubs*, anotaram-se o tipo do dente (IJ, HJ, HA, LCC, LCNC ER, LCO) e o correto posicionamento das faces correspondentes (vestibulares e linguais) para facilitar a identificação dos espécimes. A metade dos espécimes analisada em M.E.V. foi metalizada com uma camada de ouro, na espessura de 100-200Å, empregando-se o Sputter Coater- SCD050 (Bal-Tec - Liechtenstein) (**Fig. 7**). A outra metade, analisada em E.D.S. e BSE, foi recoberta com uma camada de carbono com 180-200Å de espessura, empregando-se o Med 010 (Pfeiffer Balzers) (**Fig. 8**).

Figura 6 – A - Aparelho de ponto crítico utilizado para a secagem dos espécimes. B- Gaiolas específicas com furos para secagem em ponto crítico para que o CO₂ líquido penetre nos espécimes, substituindo o etanol a 100%. Espécimes devidamente identificados no interior da gaiola.

Figura 7 – A- Aparelho para a metalização em ouro. B- Aspecto dos espécimes após metalização.

Figura 8 – A- Aparelho para deposição de carbono. B – Aspecto da superfície dos espécimes após cobertura com carbono.

4.5 ANÁLISE QUALITATIVA EM M.E.V.

Para o estudo descritivo comparativo da micromorfologia dentinária, foram obtidas imagens, em M.E.V. de pressão variável (LEO – London Eletronic Optical 435VP, Cambridge, Inglaterra – ZEISS), das regiões cervicais, vestibular e lingual da superfície fraturada dos espécimes. A exceção ocorreu no grupo de LCO, onde se deu ênfase apenas à dentina da região abaixo da lesão cariosa.

Obtiveram-se várias imagens da região cervical de todos os dentes, dividindo a região em terços: 1- próximo à superfície externa do dente, 2- região mediana da dentina (uma média foi obtida entre a superfície externa e a polpa) e 3- próximo à polpa (**Fig. 9**). O mesmo foi realizado para o grupo dos dentes com LCO, seguindo-se o mesmo protocolo de análise: 1- próximo à superfície da lesão cariosa, 2- na região média da dentina (efetuando-se a mesma média entre superfície da lesão e região próxima à polpa) e 3- próximo à polpa.

Figura 9 – Dente dividido em terços: 1- próximo à superfície externa do dente, 2- região mediana da dentina e 3- próximo à polpa, tanto na face vestibular como na lingual.

A análise comparativa da micromorfologia dentinária considerou os aspectos morfológicos descritos na **Tabela 3**.

Tabela 3- Aspectos considerados para a análise da micromorfologia dentinária.

Dentina Peritubular (DP)	Dentina Intertubular (DI)	Túbulos Dentinários (TDs)	Estruturas intratubulares (EITs)
Presente/Ausente	Compacta	Abertos	Amorfo
	Granulosa (presença ou ausência de cristais)	Parcialmente obstruídos	Aspecto tubular: - <i>Dentin casts</i> (ETf) - <i>Lamina limitans</i> (LL) -Prolongamentos odontoblásticos (PO)
		Obstruídos	Cristalino (Cristais romboédricos)

As características micromorfológicas da dentina nas diferentes condições clínicas foram, então, cotejadas com a eventual ocorrência de HD nos dentes com LCNC e ER, conforme registro no exame clínico e na anamnese do paciente.

4.6 ANÁLISE SEMIQUANTITATIVA EM ESPECTROSCOPIA POR DISPERSÃO DE RAIOS-X (E.D.S.)

As análises em E.D.S. (análise elemental semiquantitativa) foram realizadas no M.E.V. Jeol (JSM5600LV, Tokyo, Japan) empregando-se o software da Noran Instruments modelo Vantage (Middletown, WI, USA). Foram consideradas, para esta análise, as seguintes estruturas: a dentina peritubular, a intertubular e, quando presente, o conteúdo intratubular, na região vestibular, próximo à superfície externa. Os seguintes elementos químicos foram identificados, tanto em concentração como em proporção: Ca, P, Mg e S. Para a obtenção dos elementos, foram obtidos espectros por 100 segundos de livetime, com valor de deadtime de 20-25%, em cada um dos 5 pontos selecionados nas amostras. A voltagem utilizada foi de 15Kv, distância de 20mm e magnitude de 2000x. Os resultados foram analisados estatisticamente. Para comparação entre os grupos (intergrupos), foi empregado o teste ANOVA a um critério e para as comparações múltiplas, o teste post-hoc de Tukey. Nas comparações dentro de cada grupo (intragrupos), quando havia apenas 2 estruturas, foi utilizado o teste “t” pareado. Quando havia mais de 2 estruturas, foi utilizado ANOVA para medidas repetidas e o teste pos-hoc de Tukey para as comparações múltiplas. Em todos os testes estatísticos foi utilizado nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

4.7 ANÁLISE POR RETROESPALHAMENTO DE ELÉTRONS (BSE)

Realizou-se, ainda, a análise dos espécimes em BSE. Esta técnica corresponde à captação de elétrons de alta energia, originários de feixes primários de elétrons, refletidos da superfície da amostra. Ou seja, o retroespalhamento muda a trajetória dos elétrons do feixe de entrada, quando eles interagem com a amostra, sem alteração significativa da sua energia cinética. Podemos associar ao que ocorre ao jogo de bilhar quando uma bola atinge as outras. Pequenas partículas (elétrons) colidem com as grandes partículas (átomos). Portanto, átomos maiores têm maior probabilidade de produzir colisão elástica devido à sua maior área de secção transversal. Por conseguinte, o número de elétrons retroespalhados que atinge o detector de BSE é proporcional ao número atômico médio da amostra. Esse recurso permite detectar contrastes entre áreas de composição química mineral diferente. Assim, áreas de maior reflexão (mais brilhantes) sugerem regiões com maior número atômico e permitem registrar regiões de maior concentração mineral, quando comparadas com as regiões menos reflexivas (mais escuras) das amostras. Esta análise foi realizada sobre mesmas amostras preparadas para o estudo em E.D.S., considerando as mesmas regiões analisadas em M.E.V. convencional. Os detectores de BSE são comumente integrados a um M.E.V.

5 Resultados

5 RESULTADOS

Com a intenção de facilitar a compreensão das variações micromorfológicas da dentina entre os diferentes grupos experimentais, assim como entre as diferentes regiões dentinárias de cada grupo, optou-se por dividir a apresentação descritiva dos resultados em duas partes. A primeira apresenta uma descrição geral dos principais eventos, enquanto a segunda particulariza as características microestruturais de cada grupo experimental e nos terços dentinários selecionados para análise. É o que se passa a relatar.

5.1 ANÁLISE COMPARATIVA GERAL DA MICROMORFOLOGIA DA DENTINA EM M.E.V.

Dentina Peritubular (DP)

Todos os dentes deste estudo apresentaram a DP claramente visível e aparentemente intacta, uma vez que nenhum tipo de agente desmineralizante foi utilizado no preparo das amostras. Um dado importante e clássico, já descrito com frequência na literatura (STANLEY et al., 1983; PORTER et al., 2005) com relação a essa estrutura, foi que, conforme o dente envelhece na cavidade bucal, a DP aumenta progressivamente sua espessura, reduzindo o lúmen do túbulo dentinário (TD). Para os dentes HA (**Fig. 14A, G**), com ER (**Fig. 20A**) e com LCNC (**Fig. 22G, L, N**), o desenvolvimento da DP proporcionou obstrução parcial ou total dos túbulos dentinários, tanto na face vestibular como na lingual. O grupo, LCC (**Fig. 18D**) e LCO (**Fig. 16C**) mostraram a mesma ocorrência apenas na face vestibular/oclusal, nas regiões dentinárias imediatamente abaixo das respectivas lesões. As faces linguais dos dentes com LCC e ER, terço médio e pulpar, mantiveram o aspecto natural da DP.

Dentina Intertubular (DI)

A DI, evidenciada a partir da superfície fraturada, mostrou apenas uma leve variação entre os grupos estudados sem, entretanto, permitir o estabelecimento de um padrão de resposta entre eles. Nos grupos I, HJ, LCO e LCC, por exemplo, a DI pareceu apresentar um aspecto granuloso, com grande concentração de fibrilas de colágeno observada claramente por toda a superfície fraturada (**Fig. 10B, 12B, 16D, 18A**). Por outro lado, nos grupos HA e

LCNC – ambas as faces - e ER – face vestibular, região próxima à superfície – as imagens sugeriram a presença de pequenos cristais distribuídos por toda a superfície da dentina exposta pela fratura (**Fig. 14D, 20B, 22E**). Em algumas regiões desses mesmos grupos também foi possível observar uma dentina compacta, propiciando uma característica lisa à superfície, principalmente em regiões onde os TDs estavam obliterados pelo espessamento da DP (**Fig. 20A, 22G**). Entretanto, não se observaram diferenças importantes entre a DI da face vestibular e da lingual.

Túbulo Dentinário (TD)

Como já mencionado, os TDs da face vestibular e lingual dos grupos I, HJ (**Fig. 10A, 12A**) e face lingual dos grupos com LCC e ER – terço médio e pulpar (**Figs. 18K e L, 20J e K**) estavam abertos. Ao contrário, os grupos HA e com LCNC apresentaram as faces vestibular e lingual parcialmente ou totalmente obliterados por cristais ou pelo aumento na espessura da DP (**Fig. 14A, 22G**). Além disso, os grupos com LCC, LCO e LCNC, com os túbulos parcialmente obliterados pela DP (**Figs. 18H, 16C – setas, 22G**), continham estruturas de diferentes conformações: ou apresentavam a precipitação de cristais romboédricos ou cilíndricos (**Figs. 18A, 16E, 22F, M**), ou, ainda, uma estrutura cilíndrica, que ora parecia ser compacta (*dentin casts*), ora definida com cristais organizados nesta conformação, em toda sua extensão (**Figs. 18B, 16A e D, 22L e P**), ora fragmentada (**Fig. 18F, 22E**) e ora oca (**Fig. 18E**). Com relação ao conteúdo dos TDs, vale entender que foram considerados abertos aqueles que apresentaram apenas os componentes naturais da dentina hígida normal, como os prolongamentos odontoblásticos (POs), a *Lamina Limitans* (LL) e as fibrilas de colágeno. O conteúdo tubular dos grupos I, HJ, com LCC (face lingual) e com ER era constituído pelas fibrilas de colágeno, que revestiam toda a parede da DP (**Figs. 10B, 12E, 18M – setas, 20C**), assim como pelos POs (**Figs. 10D, 12F, 18M, 20F**). Em muitos casos foi possível detectar uma película que se descolava da superfície interna da DP (**Figs. 10C, 12D, 20E - seta**) e, aparentemente, de natureza independente desta, a qual se padronizou considerar como LL.

Em resumo, as características micromorfológicas dos grupos I e HJ mostraram aspectos bastante semelhantes, sem alterações notórias. Os grupos que se destacaram em alterações no conteúdo tubular foram os HA e de LCNC, que apresentaram muitos cristais por toda a extensão dos túbulos, tanto na face vestibular como na lingual, e os dentes com LCC e

LCO, na região logo abaixo da lesão cariosa, pois além da presença de cristais, apresentaram muitos *dentin casts*. Alguns *dentin casts* foram observados também nos grupos LCNC, tanto na face da lesão (vestibular) como na face lingual, porém em menor quantidade quando comparado aos grupos com LCC e LCO. Os dentes com ER mostraram-se totalmente desobliterados, com exceção da região imediatamente abaixo da exposição, porém contendo fibrilas de colágeno, LL e POs. A **Tabela 4** mostra, resumidamente, os aspectos micromorfológicos da dentina nas diferentes situações clínicas, comparando as faces vestibulares com as respectivas faces linguais.

Tabela 4 - Comparação da micromorfologia dentinária entre os grupos estudados e entre as faces vestibulares e suas respectivas faces linguais.

	DENTINA PERITUBULAR		DENTINA INTERTUBULAR		TÚBULOS DENTINÁRIOS		CONTEÚDO TUBULAR	
	vestibular	lingual	vestibular	lingual	vestibular	lingual	vestibular	lingual
I	Presente Delgada/Regular	Presente Delgada/Regular	Granulosa/sem cristais	Granulosa/Sem cristais	Abertos	Abertos	LL/ PO	LL/PO
HJ	Presente Regular	Presente Regular	Granulosa/sem cristais	Granulosa/Sem cristais	Abertos	Abertos	LL/ PO	LL/ PO
HA	Presente/Espessada	Presente/Espessada	Granulosa/com cristais ou Compacta	Granulosa/com cristais ou Compacta	Parcial e/ou Obstruídos	Parcial e/ou Obstruídos	Cristais romboédricos	Cristais romboédricos
LCO*	Presente Regular	-----	Granulosa/com cristais e/ou Fibroso e/ou Compacto	-----	Parcial e/ou Obstruídos	-----	Cristais romboédricos e <i>Dentin casts</i>	-----
LCC	Presente/Espessada	Presente Regular	Granulosa/com cristais e/ou Fibroso e/ou Compacto	Granuloso/com cristais	Parcial e/ou Obstruídos	Abertos	Cristais romboédricos e <i>Dentin casts</i>	Poucos cristais
ER	Presente Espessa	Presente Regular	Granuloso/com cristais e/ou Compacta	Granuloso/com cristais	Abertos	Abertos	LL/ PO	LL/ PO
LCNC	Presente Espessada	Presente Espessada	Granuloso/com cristais	Granuloso/com cristais	Parcial e/ou Obstruídos	Parcial e/ou Obstruídos	Cristais romboédricos	Cristais romboédricos

* **Obs:** Considerar a face vestibular, nesse grupo, como face oclusal, pois a avaliação foi feita apenas abaixo da lesão cariosa oclusal.

5.2 ANÁLISE DESCRITIVA DETALHADA DA MICROMORFOLOGIA DENTINÁRIA EM M.E.V. E BSE.

A análise descritiva detalhada que passa a ser relatada utilizou tanto os recursos da M.E.V. como a técnica do retroespalhamento de elétrons (BSE). A análise pela técnica BSE permitiu observar a variação da densidade mineral das estruturas que compõem a dentina, assim como das microestruturas presentes no interior dos túbulos dentinários, pelo registro dos contrastes entre áreas de concentrações minerais diferentes, uma vez que as áreas de

maior brilho (maior quantidade de elétrons refletidos) sugerem regiões com maior número atômico.

Para melhor registro das potenciais variações, a superfície fraturada das amostras foi dividida em terços, sendo o primeiro terço a região mais próxima da superfície externa do dente, o segundo correspondente à metade da espessura da dentina remanescente e, o terceiro, a região mais próxima da polpa.

Dentes Inclusos Jovens (IJ)

Nas amostras do grupo I, tanto na face vestibular como na face lingual (não houve diferença entre elas), foi possível notar a presença de muitos TDs que se estendiam desde a superfície externa na região da amostra até próximo à polpa (**Figs. 10A-F**). A maior parte dos TDs do terço próximo à superfície externa e do terço médio da dentina estavam vazios. Entretanto, alguns poucos apresentaram estruturas em forma de cordão, sugestivas de POs e que se projetavam para fora do lúmen dos túbulos (**Fig. 10A – setas**).

Conforme os túbulos se direcionavam para a polpa, a distância entre eles diminuía, reduzindo, também, a quantidade de DI. Essa distribuição concêntrica, típica da dentina, proporciona maior concentração de TDs nas regiões mais próximas à polpa (**Fig. 10D**). Como se pode notar pelas imagens desse grupo, os túbulos encontravam-se totalmente desobstruídos e contornados por DP de espessura regular em toda sua extensão. Fibrilas de colágeno eram frequentemente observadas no interior dos túbulos, desde a superfície externa da amostra até a pré-dentina, ou deslocadas da parede tubular, ou revestindo-a com uma verdadeira trama de fibrilas (**Figs. 10A, B, C e F – seta branca**). Por vezes, as fibrilas vistas margeando a parede interna da DP pareciam se unir de modo a formar uma película que revestia toda essa parede, presumidamente a *LL*. Não raramente notava-se que essa membrana se descolava da superfície da dentina, demonstrando ser independente dela (**Fig. 10C – setas**), e se distinguia claramente da membrana celular dos POs, esta com aspecto bastante fibroso (**Fig. 10F – setas pretas**). A presumida *LL* não foi observada na região de pré-dentina, onde se notava uma rede de fibrilas, com conformação tubular em coincidência com os POs, adentrando-se nos espaços tubulares para alcançar a dentina mineralizada (**Fig. 10D**). A maioria dos túbulos do terço dentinário próximo à polpa estava preenchida pelos POs (**Figs. 10D e F – setas pretas**).

As imagens em BSE confirmaram a ausência de estruturas com conteúdo mineral no interior dos TDs deste grupo, uma vez que a áreas correspondentes a eles mostravam-se eletrodensas. Por outro lado, a DP mostrou-se muito mais reflexiva, com aspecto brilhante e compacto, quando comparada à DI, confirmando sua característica altamente mineralizada. A DI, por sua vez, mostrava superfície irregular, com áreas claras e escuras, caracterizando o padrão desigual de deposição mineral nessa estrutura formada por um arcabouço de fibrilas de colágeno e cristais, naturalmente menos mineralizada que a DP (**Fig. 11A**).

Figura 10 - A – Terço superficial da dentina. Notar a grande quantidade de TDs próximos à superfície externa da amostra, assim como o lúmen dos túbulos bastante abertos. Também é possível localizar estruturas fibrilares deslocando-se para fora dos TDs (setas vermelhas), provavelmente, remanescentes de POs (setas vermelhas). B e C– Região média da dentina. Em B é possível notar a grande concentração de fibrilas no interior dos TDs, as quais, assim como em C (setas), se unem para formar uma película que reveste toda a superfície interna da DP, sugestiva de LL.

Figura 10 - D, E e F - Regiões próximas à polpa. Em D, observam-se os POs deixando a cavidade pulpar e penetrando na pré-dentina. Esta, por sua vez, aparece como uma região fibrilar, ainda desmineralizada, conformando os TDs. Nota-se que não há DP nesta região. Observa-se, ainda, o aumento na quantidade de túbulos por área nessa região e a consequente diminuição da DI. Em E, a fratura transversal expõe a profusão de POs, com um aspecto de “cabelo de anjo”, enquanto que em F, em aumento de 10000X, é possível notar o aspecto fibrilar da membrana celular dos POs (setas pretas), bem diferente do aspecto fibrilar da membrana (seta branca) que reveste a DP.

Figura 11 – A – Imagem pela técnica BSE das amostras homólogas aos espécimes analisados em M.E.V. Assim como em M.E.V., é possível notar a ausência de estruturas internamente aos TDs. As imagens mostram claramente a diferença de mineralização entre a DP, mais mineralizada, e a DI, menos mineralizada, através do contraste de brilho.

Dente Hígido Jovem (HJ)

O grupo HJ assemelhou-se, em todos os aspectos, com o grupo I. Tanto as faces vestibulares como as linguais apresentaram as mesmas características (**Figs. 12A-F**). Os TDs mostraram-se desobstruídos (sem cristais ou *dentin casts*), com DP de espessura regular ao longo de toda a extensão tubular. Assim como no grupo anterior, fibrilas de colágeno eram vistas revestindo a parede interna dos TDs, muitas vezes assumindo as características de uma membrana de conformação tubular, presumidamente a *LL*, a qual, eventualmente, era vista deslocada da parede dos túbulos (**Fig. 12D – seta**). Ao se deslocarem da parede tubular, deixavam clara sua independência estrutural da DP, esta com limites claramente demarcados. A *LL*, entretanto, não era distinguida nas camadas mais profundas da dentina, mormente na região da pré-dentina. No terço dentinário, próximo à polpa, podia-se notar a rica constituição fibrilar da dentina, especialmente da pré-dentina, abrigando os POs que se estendem desde o interior do espaço pulpar para o corpo dentinário (**Figs. 12E – seta preta e F**). Caracteristicamente, a pré-dentina se apresentava ainda desmineralizada, mas já definindo a estruturação dos TDs. Nessa mesma região, os POs mostravam suas membranas celulares rijas, bem conformadas e sem solução de continuidade, diferentemente do que se observava na dentina periférica ou média, onde alguns POs eram vistos com a aparência de cordões desfiados e muito delgados (**Figs. 12A - C - setas**).

As imagens em BSE do grupo HJ também foram muito similares às do grupo anterior. Confirmou-se a ausência de estruturas de conteúdo mineral no interior dos TDs, assim como se registrou maior mineralização na DP, mais compacta que a DI. (**Fig. 13A**).

Figura 12 - A e B - Região próxima à superfície externa da amostra. Notar, nessa região, a reduzida densidade tubular em comparação com as áreas mais profundas da dentina. A figura A mostra, ainda, a presença de um PO que alcança essa região (seta). Em B, em maior aumento, distingue-se claramente a DI da DP, assim como a concentração de fibrilas de colágeno no interior dos TDs (seta).

Figura 12 - C e D- Região média da dentina. Em C, notar a presença dos POs no interior de alguns TDs (setas); e em D, uma membrana de aparência fibrilar (LL) se descolando da superfície interna da DP (seta).

Figura 12 - E e F- Regiões próximas à polpa. Em E, nota-se a elevada densidade tubular. Em um dos TDs destaca-se um PO, com seu aspecto tubular e fibroso (seta preta), assim como a notória constituição fibrilar da parede interna dos TDs (seta branca). Em F, nota-se a região da pré-dentina parcialmente mineralizada, com os POs estendendo-se desde o corpo celular e ocupando os espaços intratubulares.

Figura 13 - A - Amostra do grupo HJ observado pela técnica BSE. Nessa figura é possível constatar a ausência de estruturas mineralizadas no interior dos TDs. A DP apresenta-se mais reflexiva e compacta, comparada à DI, com pontos eletrodensos por toda a superfície.

Dente Hígido Adulto (HA)

Neste grupo – face vestibular e lingual – observou-se que, mesmo na ausência de sinais visíveis de agressão, o envelhecimento dos dentes em função na cavidade oral foi capaz de estimular alterações micromorfológicas significantes na dentina, quando comparados aos grupos I e HJ. Próximo à superfície externa da amostra, foi possível observar a menor densidade tubular, isto é, menor concentração de espaços tubulares em comparação com o volume de DI (**Fig. 14A**). Os túbulos apresentavam lúmenes reduzidos, quando comparados aos grupos de dentes jovens (**Figs. 10A e 12A**), provavelmente em decorrência da esclerose dentinária. Em alguns espécimes do mesmo grupo, analisados em maior aumento, foram observados TDs contendo em seu interior densa deposição de cristais, a ponto de quase completamente obliterá-los, constituindo, provavelmente, nichos precursores da esclerose dentinária (**Fig. 14B – setas brancas**). Observou-se, também, que esses cristais encontravam-se suportados por uma trama de fibrilas no interior dos túbulos as quais, por vezes, pareciam compor a face interna de uma membrana revestindo a parede dos túbulos (**Fig. 14B – setas pretas**). Não foi possível observar a presença de POs nas regiões próximas à superfície externa dos dentes.

Na região média da dentina a densidade tubular era maior, assim como a concentração de cristais no interior dos TDs (**Figs. 14C e D**), tendência que se exacerbava conforme se deslocava em direção à polpa (**Figs. 14E e F**). Em alguns espécimes desse grupo, era comum o registro de uma DI de aspecto granuloso, demarcando claramente os limites da DP (**Fig.**

14D). Eram raros os remanescentes de POs nessa porção média da dentina e, quando vistos, apresentavam depósitos cristalinos ao seu redor (**Fig. 14C – setas**). De fato, depósitos cristalinos representavam evento comum nesse grupo experimental, podendo ser observados em toda a extensão da dentina.

Mesmo com a redução do volume das câmaras pulpares, ainda, sim, foi possível notar a presença de vários POs próximos à região pulpar (**Figs. 14F e H – setas brancas**), embora em quantidade muito inferior àqueles encontrados nos grupos I e HJ e, na maioria das vezes, associados a muitos cristais e às fibrilas de colágeno (**Fig. 14F – setas pretas**).

Ainda na região próxima à polpa, a DI mostrou-se com um aspecto granuloso, com cristais sobre sua superfície (**Fig. 14F**). Em algumas regiões, foi possível observar uma DI mais compacta, especialmente em regiões onde a DP obliterava quase totalmente os túbulos, chegando a confundir-se uma com a outra. Essa característica, eventualmente observada na região média da dentina, era especialmente vista nas regiões mais próximas à polpa, coincidente com grande quantidade de dentina terciária, esta responsável pela redução do volume da câmara pulpar (**Figs. 14E, G, H**).

As imagens em BSE deste grupo mostraram DI bastante mineralizada, com aparência bastante clara e brilhante, quando comparadas aos grupos experimentais anteriores. A DP mostrou-se irregular, variando desde áreas com aspecto semelhante em espessura aos dentes HJ, a áreas bastante espessadas, brilhantes e compactas, até áreas onde não se distinguia a DP, confundindo-se com a DI (**Fig. 15A**). Observa-se que os lúmenes dos TDs correspondem às áreas mais eletrodensas, as quais mostravam-se total ou parcialmente obliterados por estruturas cristalinas com alto teor mineral. Observa-se, ainda, o adensamento das paredes da DP, de aspecto brilhante, caracterizada pela maior reflexão de elétrons, comparada à DI circunjascente (**Figs. 15A e B**).

Figura 14 - A e B – Região próxima à superfície externa do dente. A - Notar o diâmetro reduzido dos TDs e espessura da DI. B - Em maior aumento, notar a concentração de cristais no lúmen dos TDs. C e D – Região média da dentina – Notar a maior quantidade de cristais no interior dos TDs comparado à superfície externa. Observa-se, em C, que esses cristais circundam o PO (setas). Em D, observa-se aspecto granuloso da DI. E, F, G e H – Regiões próximas à polpa. E – Notar a presença de cristais no interior dos TDs e a DP com espessura bem definida (setas).

Figura 14 - Em F, observa-se PO circundado por cristais (setas brancas), assim como fibrilas no interior dos túbulos (setas pretas). G - Visão do espaço pulpar tomado pela deposição de dentina terciária. H - Apesar da proximidade com a câmara pulpar, observa-se uma grande quantidade de DI; mesmo com a atresia pulpar, os POs são vistos no interior dos delgados lúmenes dos TDs (setas brancas).

Figura 15 - A - Notar as variações observadas na DP, desde seu espessamento, quase que obliterando totalmente os TDs, até áreas irregulares e regiões que se confundem com a DI. B - É raro observar o lúmen dos TDs, provavelmente devido à esclerose da dentina.

Dente com Lesão Cariosa Oclusal (LCO)

Nas amostras dos dentes com LCO, lembrando que a dentina deste grupo foi avaliada somente nos terços abaixo da lesão cariosa, notou-se uma morfologia bastante distinta daquelas descritas anteriormente. Primeiramente, a DI, logo abaixo da lesão cariosa, mostrou-se bastante variável. Observou-se desde uma aparência granulosa, com a presença de pequenos cristais dispersos pela superfície (**Figs. 16A, B e C**), até um aspecto fibroso, de aparência desmineralizada, muito semelhante àquele encontrado após o condicionamento ácido para impregnação do sistema adesivo (**Fig. 16C**), muito diferente da organização fibrilar encontrada na dentina normal.

Já no terço médio da dentina, assim como nas regiões próximas à polpa, apenas o aspecto granuloso, muito semelhante aos espécimes do grupo HJ, foi observado (**Figs. 16F e G**).

Logo abaixo da lesão, no terço próximo à superfície externa, na maior parte das vezes foram observados muitos TDs obstruídos parcial ou totalmente por cristais romboédricos (**Fig. 16E**), pela DP (**Fig. 16C – setas pretas**) ou por estruturas de formato tubular, denominadas *dentin casts* (**Figs. 16A-D**), ou ainda, pela associação dessas estruturas. Ocasionalmente, foram vistos túbulos abertos e, dessa forma, era possível notar a presença de fibrilas em seus interiores (**Fig. 16A – setas brancas**). Em algumas regiões, observou-se apenas a presença de cristais no interior dos túbulos, os quais pareciam estar entrelaçados a algumas fibrilas (**Fig. 16E - setas**). Os *dentin casts* apareceram de quatro maneiras: 1- ocos, lembrando um espaguete, percorrendo grande extensão do túbulo (**Fig. 16B – seta branca**); 2- preenchidos por cristais (**Fig. 16D – seta**); 3- associados a cristais que estavam depositados internamente à DP (**Fig. 16B – seta preta**) e 4- formados pelos cristais, pois, algumas vezes, apresentavam-se com aspecto granuloso (**Fig. 16A – setas pretas**). Ainda, foi possível supor que os *dentin casts* apresentam-se como estruturas individuais, distinguindo-se claramente da DP (**Fig. 16B – seta branca tracejada**) e, em algumas situações, mostrando-se como parte da DP, que se deslocara durante o preparo dos espécimes (**Fig. 16A – seta preta tracejada**).

O terço médio da dentina evidenciou apenas um ligeiro espessamento da DP, gerando uma diminuição no diâmetro interno dos TDs (**Fig. 16F**) onde, em algumas raras situações, viam-se remanescentes fibrilares dos POs (seta). Não foram observadas as estruturas tubuliformes ou cristais obliterando os TDs.

Próximo à polpa, foi possível notar que os TDs apresentaram um formato tortuoso e desorganizado, aspecto este observado apenas neste grupo. A pré-dentina não estava presente e quase não se observaram POs e fibrilas no interior desses túbulos (**Fig. 16G – setas brancas**), apenas uma membrana revestindo a parede interna do túbulo, com característica fibrosa (**Fig. 16G – seta preta**). Também foi possível notar a ausência de DP nessa região, formada basicamente pela DI. Tais características sugerem, para esta imagem, uma amostra de dentina terciária.

As imagens em BSE mostraram claramente a presença de estruturas altamente mineralizadas no interior dos TDs, logo abaixo da lesão cariosa. Foi possível notar o espessamento da DP e a existência de cristais obliterando o interior desses túbulos, assim como a ocorrência de *dentin casts*, com um grau de mineralização maior ou igual ao da DP (**Figs. 17A e B - setas**). Algumas regiões da DI evidenciaram a perda de contraste, sugerindo a diminuição da concentração de mineral, como visto na **Figura 17A**, e confrontando com o aspecto fibrilar da dentina em M.E.V. Em outras áreas da DI houve um aumento do contraste, o que sugere áreas com maior mineralização, confirmando as imagens obtidas em M.E.V., que mostraram um aspecto cristalino (**Fig. 17B**).

Nas LCOs em fase inicial, essas ETfs não estavam presentes. A única alteração morfológica notada foi um leve esclerosamento dos TDs pela deposição de poucos cristais logo abaixo da lesão cariosa. Nos outros terços dentinários, o aspecto foi bem semelhante ao grupo HJ.

Figura 16 - A, B, C, D e E – Regiões próximas à lesão cariosa. Notar a presença de cristais internamente aos túbulos dentinários, *dentin casts*, assim como a obliteração dos túbulos pelo espessamento da DP.

Figura 16 - Em B e C nota-se a aparente independência dessas ETfs, dando um aspecto de descontinuidade à DP. Em A e D nota-se a superfície granulosa dos *dentin casts*, sugerindo que essas estruturas são formadas a partir da precipitação de cristais (setas pretas). Em E, notam-se TDs obliterados parcialmente por cristais romboédricos. F – Região média da dentina. Notar os TDs desobstruídos e o ligeiro espessamento da DP dessa região. Poucos remanescentes de POs foram localizados, como mostra a seta. Em G – Notar a irregularidade dos TDs próximos à região pulpar, característica de dentina terciária. Não é possível observar DP. Os TDs encontram-se revestidos por uma membrana e contornados basicamente pela DI.

Figura 17 – A e B corroboram os achados morfológicos da dentina na região logo abaixo da lesão cariosa. Notar a presença de cristais e estruturas de formato tubular (*dentin casts* – setas brancas) preenchendo o interior do lúmen dos túbulos. Notar também a característica altamente mineralizada dessas estruturas, notabilizada por reflexão de elétrons igual ou, eventualmente, maior que a DP. Notar, em A, áreas da DI praticamente sem áreas de reflexão de elétrons, o que denota um grau de mineralização menor; em B, a grande concentração de pontos brilhantes no mesmo tipo de dentina, mostra sua característica altamente mineralizada.

Dente com Lesão Cariosa Cervical (LCC)

Este grupo apresentou características microestruturais muito semelhantes ao grupo de LCO nas áreas próximas à superfície externa. A DI nessa região mostrou-se com aspecto ora granuloso, ora fibroso (**Fig. 18A e B**), lembrando, em muito, uma dentina condicionada com ácido fosfórico. Os TDs, abaixo da lesão, estavam preenchidos por cristais com formato romboédrico (**Fig. 18A**) e/ou por *dentin casts* (**Figs. 18B, C e E**). Muitos deles, ainda, eram vistos praticamente obstruídos pelo espessamento da DP (**Fig. 18D** – **setas pretas**). Curiosamente, em algumas regiões, parecia que a DP havia sido removida (**Figs. 18B, C e E**), mantendo visível o leito dos TDs, especialmente em áreas em que a DI se apresentava com aspecto fibroso. Nessas mesmas regiões, em áreas povoadas por *dentin casts*, alguns TDs mostravam-se vazios (**Fig. 18B** – **seta preta**). Quando examinados na superfície da lesão, alguns espécimes mostravam as ETfs projetadas para além do plano dentinário, com suas extremidades expostas na cavidade oral (**Fig. 18C**), mesmo após a escavação da dentina infectada com colher de dentina.

No terço médio, a DI se mostrava com uma característica bastante semelhante àquela de dentes HA, variando de granulosa, com cristais na superfície, a compacta (**Figs. 18F-H**). Ainda nessa região, as ETfs mostravam paredes delgadas e fragmentadas, com resíduos de fibrilas e cristais em seus interiores (**Figs. 18F - setas e 18G**). Outras vezes, os TDs

mostravam-se ora completamente vazios (**Fig. 18G**), ora densamente preenchidos pelo espessamento da DP (**Fig. 18H**). Nessa região média da dentina não foram notados POs.

Neste grupo experimental, as ETfs apresentavam-se com diferentes aspectos, à semelhança do grupo LCO: 1- ocos internamente, (**Fig. 18E – seta**); 2- com a superfície granular, sugerindo sua formação a partir de vários minúsculos cristais (**Fig. 18B – setas brancas**); 3- maciços e com a superfície lisa (**Fig. 18E – seta**); ou, 4- como já descritos, quebradiços, parecendo uma membrana fragmentada (**Fig. 18F – setas**). Também, nesse grupo, não foram vistos cristais entre a DP e os *dentin casts*, como relatado no grupo anterior.

Próximo à polpa, não foram vistos cristais ou *dentin casts*, apenas alguns túbulos obliterados pela formação de uma dentina terciária reacional. Mesmo assim, foi possível notar POs penetrando os TDs na região de pré-dentina (**Fig. 18I**). Em outros espécimes, muitos POs foram vistos no interior dos túbulos, em áreas que sofreram trincas causadas por artefato de técnica (**Fig. 18J**). Nessa região, a DP apresentava-se ou ausente, ou muito delgada, característica da dentina profunda.

Quando se analisaram as faces linguais homólogas à LCC, não foram observadas ETfs com o formato de *dentin casts*, apenas alguns cristais no interior dos túbulos nas regiões próximas à superfície externa do dente (**Fig. 18K**). Já, na região média, esses TDs mostraram-se abertos, com fibrilas em seu interior, ou com uma rede de fibrilas revestindo a parede interna da DP, lembrando *LL* (**Fig. 18L – setas**). Na região próxima à polpa, notou-se uma grande concentração de TDs preenchidos por POs, onde também se observou uma DP bastante discreta e a presença de uma membrana, formada por fibrilas (*LL*), revestindo toda a superfície interna dos túbulos (**Fig. 18M – setas**).

Mesmo quando não detectados pela técnica de M.E.V. convencional, os espécimes, quando submetidos ao BSE, apresentaram cristais no interior das ETfs (**Fig. 19B**). Nestas situações as ETfs se fraturaram no sentido de seu longo eixo, expondo cristais. Ainda, na **Figura 19C** é possível observar, ao mesmo tempo, a conformação oca de algumas ETfs e, em outros, o aspecto maciço dessa estrutura. Da mesma maneira que no grupo de LCO, neste grupo, tanto os cristais como os *dentin casts* apresentaram-se com aparência mais mineralizada que a DI e semelhante à DP (**Figs. 19A e B**). Na face lingual, a análise em BSE confirmou a ausência de qualquer estrutura cristalina ou tubuliforme (**Fig. 19D**). Entretanto, observa-se a presença da DI, menos mineralizada que a DP.

Figura 18 – A-E – Regiões próximas à superfície da lesão cáries. Em A, notar cristais romboédricos, aparentemente entrelaçados por fibrilas, obliterando os TDs parcial ou totalmente. Em B, notar os *dentin casts* com aspecto granuloso (seta branca), a DI com aspecto fibrilar e a aparente ausência da DP em algumas regiões (seta preta). Em C, em uma vista da superfície escavada da lesão, notar as ETfs extruídas e expostas à superfície da dentina. Em D, observa-se outro padrão de obliteração tubular, neste caso pelo espessamento da DP (setas). Observar em E, o aspecto oco de um *dentin cast* (seta), assim como a ausência da DP. Os *dentin casts* mostram a superfície com aspecto liso.

Figura 18 – F-H– Correspondente à região média da dentina. Em F, as ETfs mostram-se com característica de uma membrana fragmentada (setas). Em G, notar um túbulo quase que totalmente obliterado por cristais. Em H, observam-se algumas áreas com obliteração total pelo espessamento da DP, assim como túbulos que estavam parcialmente obliterados (setas).

Figura 18 – I e J – Regiões próximas à polpa. Em I, nota-se a presença de uma dentina terciária, próxima a região de pré-dentina, a ausência de DP e poucos POs extruídos dos TDs. Em J, veem-se muitos POs no interior dos túbulos em uma região de fratura, assim como se nota a ausência da DP nessa região.

Figura 18 – K, L e M – Região próxima à superfície do dente, média da dentina e próxima à polpa da face lingual, respectivamente. Em K, os TDs encontram-se praticamente abertos e com poucos cristais no seu interior. Em L, notar TDs com fibrilas e uma membrana revestindo sua parede interna (setas). Em M, notar a grande concentração de TDs próximos à polpa, preenchidos por POs e com a parede interna revestida pelo que sugere ser a LL (setas). Notar, também, a ausência da DP em grande parte dos túbulos.

Figura 19 – A, B e C – Imagens em BSE das regiões logo abaixo da lesão cáriosa. Notar a presença de uma DI bastante mineralizada. Em A, observar a grande quantidade de ETfs logo abaixo da lesão e com aspecto muito mais mineralizado quando comparado às outras estruturas da dentina. Em B, perceber a presença de cristais no interior das ETfs, assim como a evidente distinção entre DP e a ETf (seta). Em C, ainda, pode-se verificar o aspecto oco de uma ETfs. Em D observa-se a dentina na face lingual. Assim como em M.E.V., é possível constatar a ausência de estruturas internamente aos TDs e DI e DP menos mineralizadas quando comparadas à face homóloga vestibular com LCC.

Dente com Exposição Radicular (ER)

Este grupo mostrou, nas regiões próximas à superfície externa da dentina, menor densidade tubular, com TDs atrésicos, com a DP bastante evidente, destacando a massa de DI (**Figs. 20A e B – setas brancas**), esta de aparência granulosa nas áreas onde os TDs estavam abertos (**Figs. 20B e C**). Também foram vistos túbulos totalmente obliterados pelo espessamento completo da DP (**Fig. 20A – setas pretas**), assim como túbulos totalmente abertos, com seu arcabouço fibrilar revestindo internamente a parede da DP (**Fig. 20C – setas**). Em apenas um espécime deste grupo foram vistos pouquíssimos cristais obliterando parcialmente os TDs (**Fig. 20D – setas**).

No terço médio da dentina, os TDs estavam abertos, evidenciando seu arcabouço fibrilar. Em alguns casos o revestimento tubular adquiria aspecto membranoso e poroso, destacando-se da parede dos TDs (**Fig. 20E – setas**). Nesta mesma região da dentina, em alguns locais em que a fratura ocorreu perpendicularmente aos TDs, a DP aparecia espessa e bem definida, enquanto do interior de alguns túbulos projetavam-se POs (**Fig. 20F – setas**). A DI, nessa região, mostrou aspecto granuloso com cristais sobre a superfície.

Nas regiões mais próximas à polpa (**Figs. 20G e H**) observou-se, caracteristicamente, a maior densidade tubular, reduzindo, naturalmente, o volume de DI. Muitos dos TDs dessa região apresentavam seus respectivos POs, os quais se estendiam por toda a dentina profunda. O aspecto fibrilar, tanto da parede interna dos TDs quanto dos próprios POs, era notado com clareza nessa região, como especialmente registrado na **Fig. 20H**, em local correspondente à fratura espontânea do espécime. No interior da trinca, observou-se a densa população de POs, apresentando-se como verdadeiros cordões distendidos e rompidos pela tensão da fratura. Como nos demais espécimes deste e de outros grupos experimentais, à margem da polpa podia-se notar a pré-dentina (**Fig. 20G**).

A superfície lingual evidenciou-se muito semelhante à face vestibular nos três terços analisados. Próximo à superfície externa, encontrou-se maior quantidade de remanescentes fibrilares dos POs quando comparada à face vestibular (**Fig. 20I - setas**). Apesar da não exposição dessa face à cavidade bucal, os TDs também mostraram-se mais atresiados (**Fig. 20I**). Uma DI com aspecto granuloso foi vista por toda a face lingual. Entretanto, no terço médio da dentina, foi visualizada uma maior quantidade de POs (**Fig. 20J**), assim como de fibrilas de colágeno, ou soltas no interior dos TDs, ou margeando a parede interna da DP (**Fig. 20K**). Próximo à polpa, as características mantiveram-se conforme o padrão para esta região dentinária, com TDs (**Fig. 20L**) contendo seus respectivos POs.

Neste grupo percebeu-se um aumento no grau de mineralização, tanto da DP como da DI, pois a análise em BSE mostrou imagens de ambas as estruturas com aspecto bastante claro e brilhante (**Fig. 21A**). Como é natural, a DP pôde ser vista mais mineralizada que a DI e, também, bastante espessada, gerando um estreitamento dos lúmenes tubulares, coincidindo com as imagens em M.E.V. convencional. Além disso, foi possível confirmar a ausência de estruturas com composição cristalina no interior desses túbulos. Não diferente da vestibular, a face lingual (**Fig. 21B**) deste grupo mostrou as mesmas estruturas com grau de mineralização bastante semelhante.

Figura 20 – A, B, C e D – Regiões próximas à superfície externa com ER. Em A, notar grande quantidade de TDs obliterados devido ao espessamento da DP (setas pretas). Ainda, nessa mesma figura, verificam-se alguns túbulos com seus diâmetros bastante reduzidos (setas brancas), o que pode ser também constatado em B (setas).

Figura 20 – Em C, notar áreas com TDs excepcionalmente abertos, nos quais se observa a arquitetura fibrosa de sua parede interna (setas). A figura D representa o único espécime do terço superficial da dentina, neste grupo, que mostrou a presença de pequenos cristais obliterando parcialmente os TDs (setas).

Figura 20 – E e F – Regiões média da dentina. Notar túbulos amplamente abertos, com membranas revestindo-os internamente, em E, e em F, notar POs deixando os lúmenes tubulares (setas). G e H – Regiões próximas à polpa. Observam-se muitos túbulos e seus POs, especialmente em H, na região correspondente ao artefato de técnica.

Figura 20 – Figuras I, J, K e L – correspondem às faces linguais do grupo com ER. I – Região próxima à superfície externa do dente. Notar atresia tubular e a presença de uma membrana no interior dos túbulos (setas). J e K – Região média da dentina. Em J, notar presença de POs no interior dos TDs (setas). Em K, notar a grande quantidade de fibrilas no interior dos TDs, assim como muitas delas margeando toda a parede interna da DP. L – Região próxima à polpa. Notar aspecto fibrilar dos POs e a grande quantidade de fibrilas nos lúmenes tubulares.

Figura 21 – A e B - Imagens das amostras vestibulares e linguais, respectivamente, do grupo ER, pela técnica BSE. Assim como em M.E.V. convencional, não se observa nenhum tipo de EIT, sejam cristais ou ETfs. Em ambas as figuras destacam-se, como áreas mais reflexivas, os perfis da DP, devido ao seu maior grau de mineralização. Notar, também, a intensa mineralização da DI.

Dente com Lesão Cervical Não Cariosa (LCNC)

As **Figuras 22A e B** mostram LCNC no formato de cunha e pires, respectivamente. Independente do tipo de lesão, as estruturas dentinárias e as alterações morfológicas decorrentes dessas lesões foram muito semelhantes. No terço próximo à superfície da LCNC, foi possível observar que alguns TDs alcançavam sua superfície (**Fig. 22B – setas brancas**) e, em outras regiões da mesma superfície, uma camada compacta com aspecto vítreo e sem túbulos, também estava presente (**Figs. 22B e C – setas pretas**), sugerindo uma camada hipermineralizada. Entretanto, a maioria dos TDs que alcançava a superfície da dentina exposta tinha a embocadura obliterada por resíduos compactados, à semelhança de uma *smear layer*. Caracteristicamente, o terço superficial da dentina apresentava baixa densidade tubular, com TDs delgados ou completamente obstruídos pela DP (**Fig. 22B**). No interior dos túbulos desta região, foi possível notar cristais com formato romboédrico, os quais preenchiem, parcial ou totalmente, a luz dos TDs (**Fig. 22D – setas**). Ainda nesta região, eram observadas ETfs aparentemente não cristalinas, de aparência fragmentada, semelhantes às aquelas encontradas em LCC (**Fig. 22E – setas**), as quais se repetiam em todos os terços da dentina. POs e *dentin casts* não foram vistos alcançando o terço externo da dentina. A DI mostrou um aspecto granuloso e cristalino, com exceção das regiões mais próximas à superfície da LCNC, esta com um aspecto mais compacto.

O terço médio da dentina (**Figs. 22F-J**) apresentou características morfológicas muito semelhantes àsquelas da superfície externa. Contudo notou-se, intratubularmente, maior

concentração de cristais (**Fig. 22F**) e de estruturas com formato tubular (**Figs. 22H e I - setas pretas**), assim como túbulos totalmente obliterados pelo aumento da espessura da DP (**Fig. 22G - setas**). Essas estruturas de conformação tubular mostravam-se ora fragmentadas e fibrosas, ora com superfícies compactas e interiores vazios (ocas) (**Fig. 22I – seta preta**). Ainda nesta figura é possível distinguir os POs, com seu aspecto fibroso e alongado (**Fig. 22I – seta branca**), as ETfs, de aparência lisa e mineralizada (**Fig. 22I – seta preta**). Nesta região foram observadas estruturas fibrosas, provavelmente resíduos de POs, sobre os quais, muitas vezes, viam-se precipitações cristalinas (**Fig. 22J – setas**). A DI se apresentava com aspecto granuloso, bem distinta da DP, esta com aparência compacta e espessa (**Fig. 22J**).

Na região próxima à polpa, algumas áreas coincidentes com o teto da câmara pulpar mostravam-se com aparência de esponja e com presença de muitas entradas tubulares com seus POs seccionados transversalmente (**Fig. 22K**). Na superfície fraturada podiam-se ver resíduos da pré-dentina e POs no interior dos túbulos (**Fig. 22K**). Nesta região foram visualizadas poucas estruturas com formato tubular (**Fig. 22L – seta preta**). Ainda, revelou-se a presença de POs estendendo-se ao longo dos TDs e denotando sua conformação fibrosa (**Fig. 22M - setas**). Muitos túbulos encontravam-se obliterados pelo espessamento da DP (**Fig. 22L – setas brancas**), assim como por cristais romboédricos que, na maior parte das vezes, estavam entrelaçados às fibrilas dos POs (**Fig. 22M - setas**).

A superfície lingual mostrou as mesmas características da superfície com LCNC, independentemente do terço dentinário analisado, com exceção da região bem próxima à superfície da lesão, onde o aspecto compacto e vítreo não foi visualizado, pois os TDs terminavam em esmalte ou cimento. No terço próximo à superfície externa, a DI era espessa e com aspecto granuloso, contendo TDs bastante delgados (**Fig. 22N**). Excepcionalmente foram notados remanescentes fibrilares dos POs alcançando essa região do dente (**Fig. 22N - setas**). Em todos os terços dentinários avaliados, a obliteração dos túbulos se deu de maneira parcial ou total pela deposição de cristais romboédricos (**Fig. 22O**), por ETfs (**Fig. 22P – seta preta**), e/ou pelo espessamento da DP. Entretanto, as ETfs foram vistas em menor quantidade em comparação com a face correspondente à LCNC.

As imagens em BSE confirmaram a característica cristalina das estruturas internas aos TDs, visualizadas em M.E.V., tanto na face vestibular com LCNC (**Fig. 23A e B**) quanto nas faces linguais homólogas (**Fig. 23C**). A DP mostrou-se mais mineralizada que a DI que, por sua vez, mostrou uma mineralização bastante elevada quando comparada a outros grupos

experimentais, lembrando a DI do grupo ER. Um aspecto interessante notado neste grupo foi que algumas imagens sugeriram os POs com um aspecto claro e brilhante, parecendo estar de alguma forma mineralizados (**Fig. 23A e C - setas**); assim como a membrana que reveste a parede interna dos túbulos, que mostrou um aspecto mais denso e com característica fragmentada (**Fig. 23B - setas**), o que não foi notado nos outros grupos. Outra diferença deste grupo foi que, apesar de as estruturas tubuliformes terem sido visualizadas em M.E.V., estas não foram observadas em BSE, provavelmente por terem se desprendido durante a fratura do espécime.

Figura 22 – Em A, notar o formato em cunha da LCNC e, em B, o formato em pires. B, C, D, E – Região próxima à superfície externa da dentina. Em B, é possível observar os TDs alcançando a superfície externa do dente (setas brancas), assim como uma superfície compacta, vítrea e sem túbulos como que recobrindo a superfície da lesão, em B e C (setas pretas). Em C, os TDs encontram-se bastante delgados, enquanto em D, cristais romboédricos preenchem o interior dos TDs.

Figura 22 – Em E, notar a presença de estruturas com formato tubular no interior dos TDs, entretanto com aspecto diferente daqueles vistos nos grupos LCO e LCC. Observar o aspecto liso e fragmentando da estrutura tubular.

Figura 22 – F, G, H, I e J – Região média da dentina. Em F, grande quantidade de cristais com formato romboédrico é vista no lúmen dos TDs. G mostra o espessamento da DP e consequente obliteração tubular (setas). Em H, notar a presença de estruturas com formato tubular (setas pretas). A imagem I permite distinguir claramente a diferença entre um PO (seta branca) e uma estrutura com formato tubular, nessa imagem com aspecto oco, (seta preta). Em J, veem-se os cristais depositados ao longo da superfície dos POs (setas).

Figura 22 – Em K, notar resíduos da pré-dentina e o teto da câmara pulpar com aspecto de esponja, abrigando os POs. Em L, encontra-se uma estrutura com formato tubular internamente a um TD (seta preta), quando constata a diferença dessa estrutura com a DP. Também, podem-se visualizar túbulos totalmente obliterados pelo aumento da DP (setas brancas).

Figura 22 – Em M, há cristais entrelaçados às fibrilas dos POs (setas). N, O e P – Face lingual homóloga à LCNC. Verificar em N, região próxima à superfície externa do dente, remanescentes de POs alcançando esse terço dentinário (setas). Em O e P, regiões correspondentes ao terço médio da dentina, vê-se o mesmo padrão das estruturas encontradas na superfície dentinária abaixo das LCNC. Observar em P a presença de uma ETf (seta preta) e de uma estrutura membranosa se descolando do interior dos TDs (seta branca).

Figura 23 - A e B - Imagens das amostras vestibulares com LCNC e, C - da face lingual homóloga, pela técnica BSE. Assim como em M.E.V., foi possível notar os cristais internamente aos TDs, a DP mais mineralizada, independentemente da face. Ainda, em B, vê-se um adensamento da membrana vista internamente aos túbulos e o seu aspecto fragmentado (setas). Em A e C, os POs, com coloração clara e brilhante, sugerem que ocorreu um processo de mineralização dessas estruturas (setas).

5.3 ANÁLISE SEMIQUANTITATIVA ENTRE OS GRUPOS DE DENTES.

Complementarmente foi possível determinar, semiquantitativamente, por meio do E.D.S., a composição das estruturas mineralizadas da dentina, assim como aquelas presentes no interior dos TDs ou em sua periferia. Os valores obtidos foram projetados em gráficos (**Fig. 24**) que representam a contagem dos elementos químicos vs. energia dispersa. Os picos representam as emissões de energia características dos elementos que compõem as amostras. Os dados semiquantitativos foram organizados em tabelas, em percentagem dos elementos nas amostras. Assim, tornou-se possível associar os eventos micromorfológicos, observados em M.E.V., com as variações do padrão de mineralização por meio do BSE e com os registros semiquantitativos dos principais elementos que compõem tais estruturas.

Figura 24 - Perfil espectral (picos) e composicional (quadro de valores) dos elementos químicos encontrados na DI, mostrando a presença de Ca, P e pequena quantidade de Mg e S. O mesmo foi realizado para a DP, ETfs e cristais.

Figura 25 - Mapeamento da figura 24, mostrando a distribuição dos elementos químicos da superfície dentinária. Notar a grande concentração de Mg (azul) e P (amarelo) sobre as ETfs, assim como um ligeiro aumento na concentração de Ca (vermelho), apesar desses elementos serem visualizados por toda a superfície da dentina fraturada.

Os percentuais médios aproximados dos elementos químicos, de acordo com os grupos experimentais e com as estruturas analisadas, correspondentes ao observado em M.E.V. podem ser vistos na **Tabela 5**.

Tabela 5 - Valores médios globais dos elementos químicos em % ($\pm$ dp) e razão Ca/P ($\pm$ dp), conforme o grupo experimental e suas estruturas.

Grupos dentários/estruturas	Ca	P	Mg	S	Ca/P	Mg/P	S/P
IJ							
DI	73,33 (6,754)	25,90 (6,712)	0,44 (0,322)	0,01 (0,018)	3,18 (1,659)	0,015 (0,011)	0,0003 (0,001)
DP	72,10 (2,817)	27,11 (2,635)	0,44 (0,278)	0,04 (0,063)	2,69 (0,398)	0,016 (0,009)	0,001 (0,002)
HJ							
DI	72,10 (2,014)	27,07 (2,017)	0,57 (0,236)	0,06 (0,086)	2,68 (0,281)	0,021 (0,009)	0,002 (0,003)
DP	71,85 (2,089)	27,21 (2,369)	0,70 (0,162)	0,04 (0,052)	2,66 (0,331)	0,026 (0,007)	0,001 (0,002)
HA							
DI	70,34 (0,292)	28,78 (0,359)	0,75 (0,113)	0,13 (0,142)	2,45 (0,039)	0,026 (0,004)	0,004 (0,005)
DP	71,83 (2,93)	27,42 (2,854)	0,64 (0,082)	0,10 (0,159)	2,66 (0,434)	0,024 (0,004)	0,003 (0,005)
EIT Cr	75,97 (6,843)	23,28 (6,454)	0,57 (0,382)	0,08 (0,085)	3,61 (1,616)	0,022 (0,013)	0,003 (0,003)
LCO							
DI	71,63 (2,21)	27,27 (2,149)	0,22 (0,418)	0,1 (0,182)	2,65 (0,299)	0,008 (0,015)	0,003 (0,007)
DP	69,62 (0,717)	28,99 (0,612)	0,49 (0,499)	0,02 (0,035)	2,40 (0,068)	0,017 (0,018)	0,0006 (0,001)
EIT ETf	68,84 (1,477)	29,58 (1,11)	0,74 (0,336)	0	2,33 (0,135)	0,025 (0,011)	0
Cr	72,53 (1,519)	26,29 (1,274)	0,31 (0,14)	0,08 (0,116)	2,77 (0,194)	0,012 (0,005)	0,003 (0,005)
LCC							
DI	72,80 (1,177)	26,73 (0,773)	0,03 (0,076)	0,24 (0,111)	2,73 (0,123)	0,001 (0,003)	0,009 (0,004)
DP	70,24 (0,585)	29,08 (0,549)	0	0,28 (0,153)	2,42 (0,061)	0	0,009 (0,005)
EIT ETf	70,79 (1,436)	28,09 (1,481)	0,54 (0,237)	0,09 (0,121)	2,53 (0,187)	0,019 (0,009)	0,003 (0,004)
Cr	70,57 (1,076)	28,66 (0,802)	0,002 (0,005)	0,12 (0,141)	2,46 (0,103)	0,00006 (0,0001)	0,004 (0,005)
ER							
DI	70,61 (4,384)	27,54 (3,225)	1,16 (0,773)	0,06 (0,085)	2,62 (0,546)	0,039 (0,026)	0,002 (0,003)
DP	70,92 (2,22)	27,66 (1,415)	0,92 (0,696)	0,06 (0,074)	2,57 (0,213)	0,033 (0,025)	0,002 (0,003)
LCNC							
DI	72,46 (1,395)	27,14 (1,22)	0,21 (0,229)	0,18 (0,049)	2,68 (0,172)	0,008 (0,008)	0,006 (0,002)
DP	72,61 (2,082)	27,21 (1,516)	0,32 (0,203)	0,05 (0,067)	2,68 (0,229)	0,012 (0,007)	0,002 (0,002)
EIT ETf	72,87 (4,111)	26,16 (3,453)	0,68 (0,700)	0,12 (0,082)	2,85 (0,567)	0,024 (0,024)	0,005 (0,004)
Cr	73,09 (3,377)	26,03 (3,289)	0,81 (0,305)	0,02 (0,028)	2,86 (0,513)	0,031 (0,010)	0,001 (0,001)

DI= dentina intertubular; DP = dentina peritubular; EIT= estrutura intratubular, ETf = estrutura tubuliforme; Cr - cristais

No que diz respeito à DP e DI dos 7 grupos estudados, a análise de variância (ANOVA) mostrou haver diferenças significantes na concentração de Mg e de S nessas estruturas (DP, $p=0,011$; DI, $p=0,001$ e DP, $p=0,003$; DI, $p=0,03$, respectivamente). Ainda, mostrou haver diferença significativa para as razões Mg/P (DP, $p=0,009$; DI, $p=0,001$) e S/P (DP, $p=0,004$; DI, $p=0,02$) nas mesmas estruturas dos diferentes grupos. Quando as ETfs foram consideradas, não houve diferença estatisticamente significativa entre os elementos químicos para os 3 grupos que apresentaram esse tipo de estrutura (LCO, LCC e LCNC). Entre os 4 grupos (HA, LCO, LCC e LCNC) que mostraram a presença de Cr no interior dos TDs, observou-se diferença estatisticamente significativa na concentração de Mg ($p=0,0008$) e na razão Mg/P ($p=0,0002$).

Para a localização das diferenças estatísticas na concentração elemental dos diferentes grupos experimentais, assim como na razão entre os elementos, para os diferentes tipos de estruturas observadas, aplicou-se o teste de Tukey ($p < 0,05$). Os resultados podem ser vistos nas **Tabelas 6, 7 e 8**.

Tabela 6 – Diferença na concentração elemental (Mg e S) em % entre os grupos e respectivos (dp), para as estruturas DI e DP. Tukey ($p < 0,05$)

	Mg – DI	Mg – DP	S – DI	S – DP
IJ	0,44 ^{A,B} (0,322)	0,44 ^{A,B} (0,278)	0,01 ^A (0,018)	0,04 ^A (0,063)
HJ	0,57 ^{A,B} (0,236)	0,70 ^{A,B} (0,162)	0,06 ^{A,B} (0,086)	0,04 ^A (0,052)
HA	0,75 ^{A,B} (0,113)	0,64 ^{A,B} (0,082)	0,13 ^{A,B} (0,142)	0,10 ^{A,B} (0,159)
LCO	0,22 ^A (0,418)	0,49 ^{A,B} (0,499)	0,10 ^{A,B} (0,182)	0,02 ^A (0,035)
LCC	0,03 ^A (0,076)	0,000 ^A	0,24 ^B (0,111)	0,28 ^B (0,153)
ER	1,16 ^B (0,773)	0,92 ^B (0,696)	0,06 ^{A,B} (0,085)	0,06 ^A (0,074)
LCNC	0,21 ^A (0,229)	0,32 ^{A,B} (0,203)	0,18 ^{A,B} (0,049)	0,05 ^A (0,067)

Letras iguais, em uma mesma coluna, indicam semelhança estatística.

Observa-se, na **Tabela 6** que a maior concentração de Mg na DI ocorreu no grupo ER (1,16%) e que este valor foi estatisticamente semelhante aos grupos IJ, HJ e HA com, respectivamente, 0,44%, 0,57% e 0,75%, os quais, por outro lado, foram estatisticamente iguais aos grupos LCO, LCC e LCNC (0,22%, 0,03% e 0,21%, respectivamente).

Quanto à DP nota-se, na mesma **Tabela 6**, que a maior concentração de Mg ocorreu, também, no grupo ER (0,92%) e que este foi estatisticamente semelhante aos demais grupos, exceto pelo grupo LCC, que não acusou a presença desse mineral. Entretanto, os grupos IJ (0,44%), HJ (0,70%), HA (0,64%), LCO (0,49%) e LCNC (0,32%) foram semelhantes, estatisticamente, ao grupo LCC.

A **Tabela 6**, que também contempla a concentração de S na DI e DP, mostra uma tendência invertida, isto é, o grupo LCC, que apresentou baixíssimas concentrações de Mg, mostra as mais elevadas concentrações de S. Na DI esse valor foi de 0,24% , o que, apesar do mais elevado, somente foi estatisticamente diferente do grupo IJ (0,01%). Os demais grupos (HJ 0,06%; HA 0,13%; LCO 0,1%; ER 0,06%; e LCNC 0,18%) foram semelhantes entre si e ao grupo IJ. Na DP os grupos LCC (0,28%) e HA (0,10%), para S, foram estatisticamente semelhantes, e este último igual aos demais: IJ (0,04%), HJ (0,04%), LCO (0,02%), ER (0,06%) e LCNC (0,05%).

A **Tabela 7** apresenta as diferenças nas razões Mg/P e S/P para a DI e DP entre os diferentes grupos experimentais.

Tabela 7 – Diferenças entre os grupos na razão Mg/P e S/P e respectivos (dp), para as estruturas DI e DP. Tukey ($p < 0,05$)

	Mg/P – DI	Mg/P – DP	S/P – DI	S/P- DP
IJ	0,015 ^{A,B} (0,011)	0,016 ^{A,B} (0,009)	0,0003 ^A (0,0006)	0,0016 ^A (0,002)
HJ	0,021 ^{A,B} (0,009)	0,026 ^B (0,007)	0,002 ^{A,B} (0,003)	0,0015 ^A (0,002)
HA	0,026 ^{A,B} (0,004)	0,024 ^{A,B} (0,004)	0,004 ^{A,B} (0,005)	0,0036 ^{A,B} (0,005)
LCO	0,008 ^A (0,015)	0,017 ^{A,B} (0,018)	0,004 ^{A,B} (0,007)	0,0006 ^A (0,001)
LCC	0,001 ^A (0,003)	0,000 ^A	0,009 ^B (0,004)	0,009 ^B (0,005)
ER	0,039 ^B (0,026)	0,033 ^B (0,025)	0,002 ^{A,B} (0,003)	0,0024 ^A (0,003)
LCNC	0,008 ^A (0,008)	0,012 ^{A,B} (0,007)	0,007 ^{A,B} (0,002)	0,0019 ^A (0,002)

Letras iguais, em uma mesma coluna, indicam semelhança estatística.

Como se pode notar, a maior proporção de Mg em relação ao P, na DI, recai no grupo ER (0,039), com valor estatisticamente igual aos dos grupos IJ (0,015), HJ (0,021) e HA (0,026). Estes últimos, por sua vez, não mostram diferença estatística em comparação com os grupos LCO (0,008), LCC (0,003) e LCNC (0,008). Quanto à DP, os grupos ER (0,033) e HJ (0,026) apresentaram as proporções mais elevadas de Mg, e foram estatisticamente semelhantes aos demais grupos, exceto ao grupo LCC, o qual não apresentou esse elemento na amostra.

Por outro lado, na DI, a razão S/P mais elevada foi encontrada no grupo LCC (0,009), valor estatisticamente semelhante aos demais grupos, exceto o grupo IJ. Este, entretanto, mostrou valor estatisticamente igual aos dos grupos HJ, HA, LCO, ER e LCNC (**Tabela 7**). A maior proporção S/P se repete na DP para o grupo LCC, o qual, no entanto, somente foi estatisticamente semelhante ao grupo HA.

Não se observou a precipitação de cristais no interior dos TDs de todos os grupos experimentais. Naqueles em que isso ocorreu (HA, LCO, LCC e LCNC), foi possível calcular as diferenças estatísticas relativamente a esse fenômeno, como se observa na **Tabela 8**. Destaca-se a concentração de Mg nos cristais do grupo LCNC, que encontra semelhança estatística apenas no grupo HA, este estatisticamente igual ao grupo LCO. A menor concentração de Mg nos cristais ocorreu no grupo LCC, ainda assim, estatisticamente igual ao grupo LCO. As mesmas relações estatísticas foram observadas na proporção Mg/P nos grupos que apresentaram essas estruturas cristalinas intratubulares (**Tabela 8**).

Tabela 8 – Diferenças na concentração (%) de Mg e na razão Mg/P nos cristais intratubulares (Tukey, $p < 0,05$).

	Mg % ($\pm dp$)	Mg/P ($\pm dp$)
HA	0,568 ^{B,C} (0,382)	0,022 ^{B,C} (0,013)
LCO	0,308 ^{A,B} (0,14)	0,012 ^{A,B} (0,005)
LCC	0,002 ^A (0,005)	0,000 ^A
LCNC	0,808 ^C (0,305)	0,031 ^C (0,010)

Letras diferentes, em uma mesma coluna, indicam diferenças estatísticas.

Quando na presença de 2 estruturas apenas, como observado nos grupos IJ, HJ e ER, aplicou-se o teste t-Student ($p < 0,05$) e este não mostrou haver diferença estatística significativa entre as concentrações dos elementos e suas razões nas diferentes estruturas.

Através do teste ANOVA para medidas repetidas (para a comparação da concentração e razão elemental na presença de mais de 2 estruturas), observou-se haver diferença nas concentrações de Ca e P e na razão Ca/P no grupo LCO, assim como nas concentrações de Ca, P e Mg e nas razões Ca/P e Mg/P nas diferentes estruturas do grupo LCC. O mesmo se fez com relação ao S e na razão S/P para o grupo LCNC. Por meio do teste de Tukey, aplicado em seguida, foi possível localizar as diferenças estatísticas nas concentrações dos mencionados elementos nos 3 grupos (**Tabelas 9, 10 e 11**).

A **Tabela 9** mostra que a concentração de Ca nos Cr do grupo LCO foi semelhante a DI, DP e diferente de ETf. Entretanto, DI e DP não mostraram diferença na concentração de Ca quando comparadas a ETf, que mostrou a menor concentração desse elemento. O inverso ocorreu com o P em relação à ETf, o qual mostrou a mais elevada concentração desse elemento, embora estatisticamente semelhante a DI e DP. As ETfs, por seu turno, foram diferentes de Cr que mostrou a menor concentração nominal de P dentre todas as demais estruturas desse grupo experimental. Como consequência desses resultados, a razão Ca/P mostrou-se nominalmente maior em Cr e estatisticamente semelhante a DI e DP. As ETfs apresentaram a menor razão Ca/P, mas semelhante, também, a DI e DP.

Tabela 9 – Diferenças na concentração, em % ($\pm dp$), de Ca e P e na razão Ca/P das estruturas que compõem o grupo LCO (Tukey, $p < 0,05$).

LCO	Ca	P	Ca/P
DI	71,63 ^{A,B} (2,21)	27,27 ^{A,B} (2,149)	2,65 ^{A,B} (0,299)
DP	69,62 ^{A,B} (0,717)	28,99 ^{A,B} (0,612)	2,40 ^{A,B} (0,068)
ETf	68,84 ^A (1,477)	29,58 ^B (1,11)	2,33 ^A (0,135)
Cr	72,53 ^B (1,519)	26,29 ^A (1,274)	2,77 ^B (0,194)

Letras diferentes, em uma mesma coluna, indicam diferenças estatísticas.

Tabela 10 – Diferenças na concentração, em % ($\pm$ dp), de Ca, P e Mg e nas razões Ca/P e Ca/Mg das estruturas que compõem o grupo LCC (Tukey, $p < 0,05$).

<i>LCC</i>	Ca	P	Mg	Ca/P	Mg/P
DI	72,80 ^B (1,177)	26,73 ^A (0,773)	0,03 ^A (0,076)	2,73 ^B (0,123)	0,001 ^A (0,003)
DP	70,24 ^A (0,585)	29,08 ^B (0,549)	0,000 ^A	2,42 ^A (0,061)	0,000 ^A
ETf	70,79 ^A (1,436)	28,09 ^{A,B} (1,481)	0,54 ^B (0,237)	2,53 ^{A,B} (0,187)	0,019 ^B (0,009)
Cr	70,57 ^A (1,076)	28,66 ^B (0,802)	0,002 ^A (0,005)	2,46 ^A (0,103)	0,0001 ^A (0,0001)

Letras diferentes, em uma mesma coluna, indicam diferenças estatísticas.

Conforme se observa na **Tabela 10**, a concentração de Ca na DI foi estatisticamente superior às demais estruturas, as quais apresentaram concentrações desse elemento iguais entre si. Esse resultado inverteu-se para o P, que mostrou concentração estatisticamente menor em DI, enquanto em DP, ETf e Cr, essas concentrações foram as mais elevadas e semelhantes entre si. Apesar disso, ETf e DI foram iguais, estatisticamente.

Em contrapartida, a diferença de Mg e da razão Mg/P na ETf foi estatisticamente significativa comparada aos outros grupos, mostrando uma concentração maior desse elemento nessa estrutura. A razão Ca/P, entretanto, foi significativamente maior em DI e semelhante à ETf, a qual mostrou razão semelhante às demais estruturas desse grupo.

Tabela 11 – Diferenças na concentração, em % ($\pm$ dp), de S e na razão S/P das estruturas que compõem o grupo LCNC (Tukey, $p < 0,05$).

<i>LCNC</i>	S	S/P
DI	0,18 ^B (0,049)	0,007 ^B (0,002)
DP	0,05 ^A (0,067)	0,002 ^{A,B} (0,002)
ETf	0,12 ^{A,B} (0,082)	0,005 ^{A,B} (0,004)
Cr	0,02 ^A (0,028)	0,001 ^A (0,001)

Letras diferentes, em uma mesma coluna, indicam diferenças estatísticas

Nesse grupo, foi possível notar que a concentração de S foi maior em DI e em ETf (**Tabela 11**). Entretanto, esta última não foi estatisticamente diferente de DP e de Cr. A razão S/P foi superior em DI e estatisticamente semelhante à DP e ETf. A menor proporção S/P foi encontrada em Cr.

6 Discussão

6 DISCUSSÃO

6.1 DA METODOLOGIA

Sabe-se que a dentina é um substrato heterogêneo e, portanto, muito difícil de ser estudado. A combinação de componentes orgânicos e inorgânicos interligados a milhões de TDs que se estendem desde a polpa até a JCE, banhados por um fluido com composição indefinida, torna essa estrutura ainda mais complexa. Essas características fazem da dentina um tecido altamente dinâmico e reativo do ponto de vista biológico. Vários instrumentos sofisticados estão disponíveis para a análise desse órgão, cada qual com uma vantagem específica e suas limitações de uso. Portanto, muitas vezes, a complementação de vários métodos é necessária para a obtenção de informações sobre esse substrato (MARSHALL JR., 1993).

Não há unanimidade, na literatura, quanto à melhor técnica para a preservação da integridade dos componentes dentinários, nem quanto às alterações que ocorrem no interior da dentina. Encontram-se na literatura diversos estudos sobre a dentina, entretanto, com empregos de metodologias diferentes (FRANK, STEUER, 1988). Poucos são os estudos que comparam, utilizando uma mesma metodologia, vários dentes em condições clínicas distintas, primeiramente pela dificuldade em se obter dentes e, segundo, porque muitas são as técnicas de preparo e análise do espécime.

O M.E.V., por exemplo, tem sido amplamente utilizado para caracterizar morfolologicamente os substratos dentinários (GARBEROGLIO, BRÄNNSTRÖM, 1976). Da imagem gerada, é possível observar detalhes das estruturas em grande aumento. Por isso, esse instrumento se torna indispensável no estudo dos aspectos tridimensionais da dentina. Um método bastante utilizado para análise do substrato dentinário é o E.D.S. Esse método registra as camadas atômicas da superfície avaliada e fornece informações da composição química dos elementos. Na dentina, é utilizado para análise das estruturas dentinárias intertubulares e intratubulares, permitindo a semiquantificação dos elementos químicos presentes no substrato, assim como a proporção entre eles. Entretanto, é um método que não possui alta resolução espacial e não é capaz de discernir com clareza as diferentes porções dentinárias. Uma das limitações do sistema M.E.V./E.D.S. é a incapacidade de separar as fases minerais de mesma composição, mas com simetrias diferentes (GARBEROGLIO; BRÄNNSTRÖM, 1976). Outro método bastante empregado é o BSE, para a caracterização microestrutural de

agregados policristalinos de qualquer natureza. Ele tem sido utilizado em conjunto com o E.D.S., o que permite a identificação de qualquer material cristalino a partir dos elementos constituintes, tornando o sistema M.E.V-E.D.S.-BSD uma poderosa ferramenta para a caracterização das estruturas minerais da dentina. Por isso, esse foi o sistema de análise selecionado para este estudo. Dessa maneira, foi possível avaliar morfolologicamente as estruturas da dentina e suas alterações em diferentes condições clínicas, fazer a análise da concentração de minerais sobre as estruturas dentinárias e EITs e semiquantificar os elementos atômicos presentes nas mesmas estruturas.

Para o preparo dos espécimes dentários, que antecipa a fase de análise, técnicas específicas são utilizadas para preservar ao máximo as dimensões da dentina (THOMAS, 1983; CARVALHO et al., 1996). Entretanto, deve-se sempre prever modificações devido a artefatos de técnicas causados pelo próprio preparo dos espécimes, seja durante os cortes e as fraturas, fixação, desidratação ou secagem, ou mesmo pela simples manipulação. Tais artefatos devem ser esperados e corretamente interpretados para que não ocorram equívocos.

Todavia, é impossível afirmar que as estruturas observadas não tenham sofrido artefatos de técnica. A metodologia deste estudo foi baseada em um estudo anterior (CALABRIA et al., 2008), que mostrou que os melhores resultados para a visualização da dentina ocorreu com a fixação e posterior fratura dos espécimes. Optou-se pela fratura dos espécimes, neste estudo, para evitar o uso de discos, brocas e lixas de polimento, que contribuem para a destruição de elementos importantes da dentina, prejudicando a análise e a correlação entre suas estruturas, como observado em alguns estudos (MANIATOPOULOS; SMITH, 1983; CALABRIA et al. 2008). O corte ou desgaste dos dentes levam à formação de resíduos compactados na superfície do espécime, prejudicando a interpretação dos resultados pois, para removê-los, é preciso lançar mão de agentes desmineralizantes (YOSHIYAMA et al., 1996; CALABRIA et al. 2008). Isso acarreta a perda significativa de minerais na região de DI, assim como provoca a descaracterização de estruturas importantes para a análise das modificações de dentina causada pelos fenômenos clínicos, como, por exemplo, o que ocorre com a própria DP. Assim, considerou-se que a fratura dos espécimes proporciona melhores condições para análise das estruturas dentinárias abaixo da lesão ou da superfície dentinária exposta ao meio bucal. A perda de estruturas ou de seus conteúdos minerais levaria a resultados de E.D.S. não coerentes com o estado original dos espécimes. Obviamente, a opção por esta conduta pode proporcionar outros tipos de interferência na natureza dos espécimes, como o deslocamento e a perda de algumas estruturas (Ex: ETf e Cr) durante a tensão de

fratura. Entretanto, esse tipo de interferência ainda é menos prejudicial à interpretação dos fenômenos do que seriam as alterações provocadas pelo corte com brocas ou discos.

Após a extração, os dentes foram imediatamente inseridos em solução de Karnovsky para garantir a fixação das estruturas orgânicas da dentina. Permaneceram armazenados por, no mínimo, uma semana para que a solução pudesse penetrar por toda a extensão da estrutura dentinária. A opção por esse procedimento baseou-se em estudos de GORACCI; MORI; BALDI, 1999, que mostraram que apenas 24h não são suficientes para que a solução penetre por toda a dentina e fixe corretamente suas estruturas. A imersão imediata dos dentes em solução de Karnovsky também foi proposital, porque outros estudos sugerem que a fratura da dentina, previamente à fixação, altera significativamente as estruturas dentinárias (THOMAS (1983). Portanto, com a fixação prévia, corre-se menor risco de alterações no estado natural do espécime. Esse mesmo autor (THOMAS, 1983) sugere, ainda, que o glutaraldeído utilizado isoladamente com agente de fixação não é suficiente para garantir a preservação das delicadas estruturas presentes na dentina. Assim, recomenda a incorporação do p-formaldeído, o que possibilita uma rápida penetração da solução e melhor fixação dos tecidos. A solução fixadora Karnovsky é uma combinação de formaldeído, em baixa proporção, com glutaraldeído. O primeiro é, originalmente, um gás que pode ser também obtido na forma líquida e, assim, chamado de formalina, a qual penetra os tecidos rapidamente (LOPES; PERDIGÃO; GERALDI, 2002). O glutaraldeído é um dialdeído que penetra lentamente nos tecidos, mas, devido à sua bifuncionalidade, promove ligações cruzadas com as proteínas, estabilizando-as. A combinação de ambos promove uma penetração rápida nos tecidos, sobretudo quando sua permeabilidade é baixa, justificando a opção por tal solução fixadora para este estudo.

Sabe-se que a utilização do tetróxido de ósmio como complemento de fixação poderia ampliar o espectro de observação das estruturas dentinárias. Trata-se de um agente fixador excelente e que possui átomos eletrodensos que atuam como corante, conferindo contraste às amostras e melhor qualidade de visualização ao M.E.V. Entretanto, para o presente estudo, este agente não foi utilizado pelo fato de ser um metal pesado e que, certamente, interferiria nas leituras em E.D.S. (LOPES; PERDIGÃO; GERALDI, 2002).

Para a análise em M.E.V., os espécimes devem ser secados para posterior cobertura em ouro ou carbono. Quando a amostra é muito frágil, a tensão superficial do etanol usado na desidratação, ao final da secagem ao ar livre, pode destruir detalhes superficiais ou causar o

colapso de partes dos espécimes, criando inúmeros artefatos (KITAJIMA, 1999). Esse problema é, usualmente, contornado utilizando-se a secagem em ponto crítico. Dessa forma, evita-se o colapso das fibrilas colágenas, POs e das EITs, mantendo-as em posição mais próxima do real. Segundo Breschi et al. (1999), Kelly, Bergenholtz, Cox (1981) o meio convencional de secagem dos espécimes afeta negativamente a visualização da ultraestrutura dentinária e consideram o ponto crítico a técnica ideal para a preparação das amostras.

A análise em M.E.V. foi feita em uma metade do espécime, enquanto E.D.S. e BSE foram realizados na outra contrametade, uma vez que a cobertura ideal para M.E.V., o ouro, não permite a correta análise em E.D.S. que, portanto, deve ser feita com carbono. O ouro é um metal muito pesado e excelente para refletir os elétrons secundários que incidem sobre a amostra, gerando imagens por reflexão. Entretanto, ele interfere na análise dos números atômicos, diferentemente do carbono, que permite a interação dos feixes de elétrons sobre a amostra. Além disso, fazer primeiramente a cobertura com carbono e em seguida a cobertura com ouro, como foi experimentado em projeto piloto, prejudicou a qualidade das imagens.

Também foi possível observar, em todos os grupos, vários ângulos de fratura da dentina. Aqui, deve-se lembrar que a fratura dos espécimes acontece de maneira errática, muitas vezes expondo os TDs longitudinalmente, abrangendo quase toda a sua extensão; outras vezes, obliquamente e, ainda, transversalmente à superfície. Muitas vezes, os três tipos de fratura ocorriam na superfície da mesma amostra. As fraturas transversais dificultavam a análise do conteúdo tubular, porque somente suas embocaduras ficavam visíveis. Entretanto, permitia uma análise mais detalhada da DI, facilitando a descrição das diferentes dentinas.

Neste estudo, foram obtidos 5 dentes por grupo. Essa quantidade limítrofe para se realizar uma análise estatística se deve ao fato da dificuldade em se obter dentes com características clínicas isoladas, propostas no trabalho. Dentes com indicação para extração normalmente são dentes molares inclusos ou semi-irrompidos de pacientes jovens, com finalidade terapêutica, ou de pacientes com idade mais avançada com doença periodontal. Estes, geralmente, relaxaram na higienização oral devido à dor durante o ato da escovação, levando os dentes à necessidade de extração. Além disso, na maior parte das vezes, os dentes indicados para extração já possuíam algum tipo de material restaurador e, consequentemente, não eram adequados para este estudo. Esse fato ocasionou, para alguns grupos, como os de dentes HA, com LCC e LCNC, a necessidade de trabalhar com grupos dentários diferentes. Idealmente, opta-se por realizar análises em grupos dentários semelhantes para reduzir as

chances de variabilidade. Mesmo assim, as respostas do complexo dentinopulpar encontradas foram muito semelhantes em todos os grupos, não acarretando divergências de informação.

A região dentinária cervical foi a eleita para a análise da dentina, uma vez que o objetivo primário era comparar as variações da morfologia dentinária das LCNCs com as demais condições clínicas consideradas para este trabalho, fonte de muitas pesquisas pelas alterações que incidem tanto na superfície das lesões como no corpo da dentina abaixo delas (YOSHIYAMA et al., 1989). Essas alterações, muitas vezes, são observadas por toda a extensão dentinária, alcançando a polpa. Todavia, optou-se por avaliar a dentina e as respostas do complexo dentinopulpar em suas diferentes profundidades, dividindo-a em terços. Assim, os pontos selecionados para observação em M.E.V., para todos os grupos experimentais, eram: logo abaixo da superfície dentinária, considerado o terço externo da dentina; no terço médio do corpo dentinário; e no terço próximo à polpa (região profunda de dentina). É importante compreender que, nos grupos LCC, LCO e LCNC, as lesões já invadiam certa profundidade de dentina alcançando, praticamente, o seu terço médio. Portanto, a proximidade com a polpa era muito maior quando comparada aos demais grupos, e as respostas do complexo dentinopulpar, portanto, muito mais intensas nas regiões consideradas superficiais, para estes grupos.

Os dentes IJ serviram como *gold standard* para comparação com os demais grupos. Protegidos dos estímulos próprios da cavidade bucal, além de serem dentes jovens, proporcionavam a observação de todas as características de uma dentina não afetada. Nessas condições, permitia-se observar o quanto a presença dos dentes na cavidade bucal poderia resultar em alterações das estruturas dentinárias, como ocorre, por exemplo, com os grupos HJ e HA. Os dentes HJ permitiram observar se o pouco tempo de permanência na cavidade bucal foi capaz de induzir respostas significativas do complexo dentinopulpar.

Os dentes com LCO foram introduzidos no estudo para servirem de comparação com o grupo LCC. Sem esse grupo não seria possível afirmar se as alterações estruturais encontradas em dentes com LCC eram específicas de lesão cáriosa ou da região anatômica do dente. Os grupos LCNC e ER fechavam o quadro comparativo entre os dentes com lesão ou com simples exposição dentinária cervical (ER), posto que seria razoável considerar que a dentina acometida por cárie apresentaria alterações estruturais diferentes da dentina simplesmente exposta ao meio bucal, seja por um processo erosivo ou por simples recessão gengival.

Complementarmente, a opção pela introdução do grupo ER partiu de uma dúvida surgida em estudo anterior, em que estruturas dentinárias de formato peculiar (ETf) eram comumente vistas em regiões acometidas por LCNC. Seriam tais estruturas típicas das LCNC, ou próprias da região cervical? Como se sabe, nesta região dental concentram-se as tensões geradas pela mastigação. Por outro lado, independentemente da etiologia, a exposição dentinária ao meio bucal pode dar início a um processo de reação do dente pelo aumento da permeabilidade dentinária (MJÖR; FEJERSKOV, 1985). Essa reação pode se dar, basicamente, sob a forma de “esclerose” da dentina, deposição de cristais intratubulares ou formação de dentina terciária, dependendo da natureza, intensidade e duração do estímulo (STANLEY et al., 1983).

6.2 DA MORFOLOGIA DENTINÁRIA E ESTRUTURAS INTRATUBULARES

Os dentes IJ mostraram uma morfologia correspondente àquela descrita na literatura (JOHANSEN, PARKS, 1962; GORACCI, MORI, 1995), que reconhece na dentina hígida as seguintes estruturas: DI, DP, POs e fibrilas de colágeno margeando a superfície interna dos TDs. Tais características eram esperadas, pois os dentes não haviam sido expostos ao ambiente oral e, portanto, não haviam sofrido nenhum tipo de estímulo direto. As estruturas observadas no grupo HJ foram muito semelhantes às do grupo IJ, mostrando que o pouco tempo de permanência na cavidade bucal não foi suficiente para induzir respostas significativas na morfologia dentinária.

Das estruturas visualizadas em ambos os grupos, chamou a atenção a grande concentração de fibrilas de colágeno margeando toda a parede interna dos TDs, desde a JCE até próxima à região da pré-dentina (**Fig. 27**), assim como descrito por Muylle et al., 2000. De acordo com Dai et al. (1991), as fibrilas colágenas intratubulares são formadas pelos odontoblastos e, portanto, sua distribuição reflete a atividade desta célula nos dentes imaturos ou jovens. Consequentemente, não é surpresa que a maior concentração de fibrilas seja visualizada próximo à polpa, onde se encontram os corpos celulares.

Em muitos espécimes era possível notar uma membrana, aparentemente também formada por fibrilas, sugerindo ser o que alguns pesquisadores denominam de *lamina limitans* (LL) (THOMAS, 1984; PAGAVINO; PACE; PIERLEONI, 1991; GORACCI, MORI, BALDI, 1999; YOSHIBA et al., 2002). Para efeito de descrição e diferenciação, tanto das

ETfs como dos próprios POs, tais estruturas passaram a ser consideradas como *LL*. Tal dúvida decorre do fato de a *LL* ser de natureza quase virtual e considerada, por alguns autores (YOSHIBA et al., 2002), um artefato de técnica, por ser apenas uma área de concentração de proteínas (fosforinas e glicosaminoglicanas) que regem o processo de precipitação de minerais na periferia dos TDs. Entretanto, os mesmos autores explicam que se essa estrutura fosse um artefato, ela seria vista também na região de pré-dentina, o que não ocorreu em suas amostras, coincidindo como que se observou no presente estudo. Outros (YOSHIYAMA et al., 1990; GRÖTZ et al., 1998; FRANK, 1999; GRÖTZ et al., 2000; 2003) a definem como uma delgada membrana, visualizada sob técnicas de microscopia de transmissão, varredura ou com marcadores específicos. Em alguns espécimes da presente pesquisa, entretanto, era possível observar uma estrutura que, não sendo nenhuma das entidades normalmente identificadas na dentina (ETf, DP ou PO), passou a ser considerada como *LL*. Algumas imagens pareciam identificar claramente essa membrana se descolando da superfície interna dos TDs, como pode ser visto na **Fig. 26**. Notou-se, também, que essa *LL* era bastante diferente da estrutura de um PO, pois estavam presentes em grande quantidade em regiões onde poucos POs eram vistos ou, ainda, visualizadas juntamente com um PO, como entidades distintas, embora intimamente relacionadas (**Fig. 27 – setas**). Assim, parece razoável considerar a *LL* uma estrutura distinta dos POs, o que coincide com a opinião de outros autores (MANIATOPOULOS, SMITH, 1983; THOMAS, CARELLA, 1984; SIGAL et al., 1984).

Figura 26 – Notar uma estrutura com característica membranosa e composição fibrilar se descolando da superfície interna da dentina (DP), denominada no estudo como *LL*.

Figura 27 – Notar fibrilas margeando a superfície da dentina (setas brancas) claramente distinguível de um filete fibroso e espesso (setas pretas), os POs, próximo à região pulpar. Notar ainda que as fibrilas parecem se conectar com a superfície dos POs – setas pretas.

A *LL* apresenta, aparentemente, como componente primário, um lipídeo (YOSHIBA et al., 2002) acompanhado de glicoproteínas, particularmente as glicosaminoglicanas, que parecem exercer papel regulador na precipitação mineral nessa região (SAUK et al., 1976; THOMAS, 1984; TAKAGI et al., 1990; PAGAVINO; PACE; PIERLEONI, 1991). As glicosaminoglicanas são polímeros de dissacarídeos, também chamadas de mucopolissacarídeos ácidos, geralmente hexosaminas ou ácido urônico. Podem compreender grupos de estersulfatos, os quais, assim como os grupos carboxilatos do ácido urônico, são locais de reação das proteoglicanas dos tecidos. A literatura relata uma diferença no conteúdo de proteoglicanas na dentina e na pré-dentina, o que indica que estes constituintes podem participar ou ter algum efeito na mineralização da dentina (ARANA-CHAVES, 2004). Assim, a *LL* seria uma barreira reguladora das trocas de substâncias entre o fluido pulpodentinário, supersaturados de íons cálcio e fosfato, e a dentina (BRADFORD, 1958).

Embora não seja afetada por processos de desmineralização, a *LL* pode ser digerida pela hialuronidase. A susceptibilidade da *LL* à digestão por essa enzima indica seu alto conteúdo de glicosaminoglicanas, sugerindo, então, que seja uma estrutura de natureza extracelular e, portanto, não deve ser confundida com os POs (THOMAS, 1984; YOSHIBA et al., 2002). Essa constatação é confirmada por outros autores (YOSHIBA, et al. 2002), os quais também observaram que a *LL* pode ser vista desde o limite pulpodentinário até a JAD,

ao contrário dos POs, estes detectados apenas na região da dentina mais profunda. Realmente, em um estudo anterior (CALABRIA et al., 2008), foi possível notar que essa estrutura não foi removida mesmo após condicionamento com ácido fosfórico por 15 segundos, o qual removeu toda a DP, ou após a ação da NaOH por 5 minutos, mantendo-se no interior dos TDs. Por outro lado, mesmo na presença de dentina terciária e quando os TDs não estavam obstruídos pela DP, cristais ou ETfs, era possível visualizar a LL (**Fig. 28 - setas**), como visto por GORACCI, MORI, BALDI, 1999; GORACCI et al., 1999.

Segundo Szabó, Trombitás e Szabó (1985), é possível que apenas alguns POs sejam vistos ao longo de toda extensão de seus respectivos TDs. Isso ocorre devido à natureza elástica dos POs, de tal maneira que, uma vez seccionada a dentina, eles sofrem retração e, por isso, não são vistos nas partes mais externas da dentina. Apesar disso, algumas imagens do presente estudo sugeriam a presença de remanescentes de POs próximos à superfície externa da dentina nos grupos IJ, HJ e ER. Nestes casos, apesar do aspecto fibrilar, essas estruturas eram mais espessas e de conformação tubular, diferentemente das fibrilas de colágeno que revestiam a DP. Mesmo com o método de fixação adotado e com a desidratação dos espécimes em ponto crítico, é esperada uma contração de aproximadamente 26% das amostras orgânicas, o que pode explicar porque poucos POs são visualizados na dentina periférica ou próximos da JCE (KELLEY; BERGENHOLTZ; COX, 1981; SIGAL et al., 1984). Ainda assim, os grupos de dentes mais jovens ou sem alterações estruturais permitiram observar POs próximos à junção esmalte/cimento, apesar de muitos autores afirmarem que os POs se limitam a alcançar o terço próximo à polpa (THOMAS, CARELLA, 1984; GORACCIM MORI, BALDI, 1999; YOSHIBA et al., 2002). Esta situação pode indicar que, de fato, a visualização dos POs em regiões distantes da polpa é dependente, dentre outras causas, da técnica de preparação dos espécimes de dentina.

Entre outras causas, estão as reações do complexo dentinopulpar aos estímulos externos e o próprio envelhecimento natural dos dentes (STANLEY et al, 1983). De fato, os demais grupos experimentais do presente estudo não mostraram remanescentes fibrilares sugestivos de POs em regiões distantes da polpa. Parece pertinente considerar que, com o passar dos anos, os POs vão se distanciando da JCE/JAD, em decorrência do estrangulamento dos TDs, causado pelo aumento da DP, ou pela deposição de dentina terciária na periferia pulpar, deixando atrás deles, TDs vazios (*tratus mortus*) ou escleróticos (STANLEY et al, 1983).

Figura 28 – Dente HA. Observar, mesmo na presença de uma dentina reacional, uma membrana revestindo a parede interna das DPs, com aspecto fibroso (setas).

As alterações mais comumente observadas na dentina pela ação do tempo, por lesões cariosas ou lesões não cariosas são: a esclerose dentinária e a dentina terciária, reparadora ou reacional (STANLEY et al., 1983; MJÖR, FEJERSKOV, 1985). Com a idade, a dentina normal começa a sofrer alterações, a chamada esclerose dentinária ou dentina translúcida (BRADFORD, 1958). Os TDs vão sendo gradualmente preenchidos por uma fase mineral, que se inicia na porção mais apical da raiz e vai se estendendo para a porção coronária, desde a periferia da dentina, possivelmente por um processo de precipitação química passiva, diminuindo a abertura dos lúmenes tubulares (VASILIADIS; DARLING; LEVERS, 1983).

No presente estudo, nos grupos HA e LCNC, observou-se a DP obliterando ou reduzindo a luz dos TDs em toda a extensão dentinária. Nos grupos ER, LCC e LCO, a diminuição da luz dos TDs ocorreu apenas imediatamente abaixo da exposição radicular ou da lesão cariosa. Segundo Mjör e Fejerskov, 1985, a esclerose dentinária é provavelmente a primeira reação pulpar contra as lesões superficiais, onde os POs degeneram parcialmente, deixando os TDs vazios. Sabe-se também que os estímulos mais intensos sobre a dentina levam a uma aceleração do processo de depósito mineral nas paredes internas da dentina, diminuindo a abertura do lúmen tubular ao longo do tempo (PASHLEY, 1986; PASHLEY et al., 2002).

É importante lembrar, neste ponto da discussão, a conotação genérica que se dá nesta investigação ao termo “estruturas intratubulares”. Estas devem ser interpretadas como qualquer das entidades descritas anteriormente, isto é, POs, Cr, *LL* ou ETfs. Em momentos específicos, é dado o devido destaque a cada uma delas, conforme sua identificação, suas possíveis consequências e função.

As observações feitas desde os grupos IJ, HJ e HA, até os grupos envolvendo episódios “patológicos” (LC, LCC, ER LCNC), permitiram registrar uma sequência de eventos. Essa sequência pode culminar ou com a completa esclerose dos TDs, ou com a formação de estruturas de conformação peculiar, aqui identificadas como estruturas tubuliformes (ETf). Entre uma condição e outra, parece predominar um fenômeno intermediário, que se manifesta a partir dos dentes HA e prossegue nos dentes lesados, que é a precipitação de Cr. Nos dentes HA observou-se intensa precipitação de Cr, tanto no corpo da DI como internamente aos TDs, na parede interna da DP. Esses cristais também foram vistos nos demais grupos, exceto nos grupos IJ e HJ. Daculsi et al. (1987) e, mais recentemente, Porter et al. (2005), registraram que, na esclerose dentinária (dentina translúcida), decorrente do envelhecimento ou da presença de cárie, ocorre precipitação de cristais de tamanhos nanométricos na DIT, enquanto cristais maiores se depositam internamente aos túbulos, sugerindo um processo de dissolução e reprecipitação mineral na formação da dentina translúcida.

A precipitação de cristais com aspectos esferoidais e, principalmente, romboédricos, também foi vista no interior de alguns túbulos no grupo LCNC, também descritos na literatura (SZABÓ; TROMBITÁS; SZABÓ, 1984; YOSHIYAMA et al., 1989, 1990). Nos grupos LCO e LCC, a presença de Cr era considerável e, muitas vezes, acompanhados de ETfs, especialmente nas regiões imediatamente abaixo da superfície das lesões. As imagens obtidas a partir do BSE identificam a natureza mineral dessas estruturas. Entretanto, nas regiões média e profunda de dentina, os TDs encontravam-se livres dessas estruturas. Os espécimes desses dois grupos mostraram grande similaridade estrutural, como previsto por Frank (1968), sugerindo que a região do dente, seja oclusal ou cervical, vestibular ou lingual, não potencializa alterações dentinárias individualizadas, contrariando estudo anterior (AZRAK, 2003).

Também, nos grupos HA e LCNC, foram observados cristais cilíndricos e romboédricos depositados sobre os POs. Nas imagens de BSE foi possível notar que esses

POs apresentavam características mineralizadas, pois possuíam uma densidade mineral muito semelhante àquela dos cristais no interior dos TDs e da DP. Esses cristais puderam também ser vistos entrelaçados às fibrilas de colágeno, presentes no interior dos TDs. Frank e Voegel (1980) relataram características semelhantes a essas, particularmente abaixo de lesões cariosas.

No grupo ER, em muitas nas regiões limítrofes entre a dentina exposta e a superfície fraturada, notava-se uma estrutura vítrea, sugerindo áreas de hipermineralização. Em alguns casos isso também ocorreu no grupo LCNC e, tanto neste grupo como no anterior, sugeria a ação de fatores salivares e o uso de produtos fluoretados pelos pacientes. Esta hipótese é corroborada por BRÄNNSTRÖM; JOHNSON; NORDENVALL (1979). Esse fator foi provavelmente o responsável pela ausência de EITs, já que os TDs, uma vez bloqueados, impedem ou reduzem os estímulos sobre o complexo dentinopulpar. MJÖR, FEJERSKOV (1985) concluíram que a permeabilidade dentinária é provavelmente o fator mais importante na determinação das reações pulpares.

A micromorfologia da dentina afetada pela lesão cariosa variou conforme a progressão e extensão da lesão. Essa variabilidade também foi apontada por Arnold et al. (2007). Enquanto as lesões cariosas menos invasivas apresentavam Crs intrabulares nas regiões imediatamente abaixo da lesão, nas lesões cariosas mais avançadas era comum a existência de ETf. Essa variação pode sugerir as ETfs sejam desenvolvidas como resposta a um estímulo de longa duração, quando a concentração de Crs termina por se consolidar numa conformação tubular. De fato, em muitos casos, as ETf eram vistas com inúmeros Crs em seu interior, mostrando a efetiva participação da precipitação cristalina na formação e no amadurecimento dessas estruturas. Tanto no grupo LCO como o LCC a DI se mostrou desmineralizada e, em certa extensão sem a DP, provavelmente dissolvida pelos ácidos bacterianos.

Nessas mesmas regiões dos dentes com LCC, em áreas povoadas por ETfs, alguns TDs mostravam-se vazios (**Fig. 18B – seta preta**). É importante salientar que a ausência de ETfs em regiões onde sua presença era esperada não significa que elas não tenham existido, já que, como se mencionou anteriormente, isso decorre do deslocamento provocado pela fratura do espécime. Em algumas situações perdia-se, também, a DP. Observe-se, ainda, que as LCC, ao contrário das LCO, são, geralmente de natureza crônica, o que proporciona uma dentina com menos umidade e, conseqüentemente, com menor elasticidade do que a dentina com

cárie ativa, fato que induz maior tensão durante a fratura dos espécimes e perda de algumas estruturas.

Quando examinados a partir da superfície exposta da lesão, alguns espécimes mostravam as ETfs projetadas para além do plano dentinário, com suas extremidades expostas na cavidade oral (**Fig. 18C**), mesmo após a remoção da dentina cariada superficial. Tal fato mostra que o corpo da dentina sofre alterações dimensionais, uma contração, no caso, em padrões diferentes das ETfs e que estas, provavelmente, apresentam composição ou concentração mineral diferentes da DI. De fato, como se discutirá adiante, esta variação, embora mínima, muitas vezes ocorre e é suficiente para alterar as propriedades das ETfs.

Alguns estudos aventaram a possibilidade de que as ETfs eram peculiares e exclusivas de LCNC (YOSHIYAMA et al., 1989, 1990, 1996; AZRAK, 2003). No entanto, em estudo anterior, essas estruturas foram detectadas também na face lingual, oposta às LCNCs (CALABRIA et al., 2008), o que pode apontar para um processo degenerativo crônico da dentina, não exclusivo deste evento clínico. Ainda, essas ETfs foram observadas associadas ou não a cristais em ambas as faces e por toda a extensão dentinária. Nos dentes com LCC e LCO, essas estruturas foram visualizadas em grande quantidade imediatamente abaixo da lesão cariosa. Portanto, a curiosidade em se observar a morfologia da face lingual ocorreu para poder comparar se as alterações que atingem a face vestibular podem ser transferidas para a face lingual. O grupo LCC foi o único que apresentou a face vestibular diferente da lingual.

Considerações sobre a presença das ETfs têm relevante significado clínico. Yoshiyama et al. (1989, 1990), mapeando a microestrutura de áreas hipersensíveis em LCNC, observaram que onde os TDs se encontravam obstruídos por Cr não havia sensibilidade dentinária. Por outro lado, a região sensível da dentina era aquela em que existiam ETfs, às quais denominou *dentin casts*, no interior dos túbulos. Uma vez que são estruturas ocas e que se estendem por todo o TD, elas garantem a hidrodinâmica do fluido pulpodentinário. Em um estudo anterior, CALABRIA et al. (2008) (**Fig. 29**) encontraram a mesma correlação entre HD e a presença de ETfs. Na presente investigação, a ocorrência de ETfs nos espécimes com LCNC foi rara e, coincidentemente, as manifestações de sensibilidade dentinária muito baixas, o que parece estar alinhado com os achados anteriormente mencionados.

Abre-se, aqui, uma importante discussão sobre as prováveis causas da HD. Embora a compreensão da dinâmica dos fluidos no interior dos TDs forneça enorme confiabilidade à

teoria hidrodinâmica, é possível que outros fenômenos possam auxiliar na transmissão do estímulo até as terminações nociceptoras intrapulpares. Os estudos (AZRAK, 2003; YOSHIYAMA et al., 1996), que empregaram ácidos na preparação das amostras, evidenciaram que as ETfs, além de estarem livres no interior dos túbulos, devido à dissolução da DP, ainda se projetavam para além da superfície da amostra. Isso ocorria em consequência do colapso da dentina superficial, causado pela desidratação convencional dos espécimes. Em uma situação clínica real, após a ingestão de substâncias ácidas, não é absurdo supor que as extremidades expostas e instáveis das ETfs sofram deslocamentos microscópicos no interior dos túbulos, provocados por estímulos físicos ou mecânicos eventuais. Sendo isso factível, a teoria hidrodinâmica poderia bem estar sendo coadjuvada pela instabilidade física do conteúdo intratubular mineralizado que, por sua vez, afeta as terminações nervosas na margem pulpar.

Figura 29- Exemplo de uma amostra de dentina retirada de uma LCNC com registro de HD. Depois de fraturados e condicionados com ácido fosfórico a 5%, por 15 segundos, ocorreu dissolução da DP. Notar que as ETfs mantiveram-se no interior dos TDs. Notar, também, a presença de cristais no interior de uma ETf - setas (3000X) (CALABRIA et al., 2008).

De qualquer modo, a origem dessas ETfs e a compreensão dos fenômenos envolvidos em seu processo de formação ainda carecem de evidências científicas. Alguns autores têm afirmado que as ETfs são de origem intracelular, isto é, são produtos do metabolismo que ocorre no interior dos POs, os quais, por algum fenômeno bioquímico, iniciam um processo de mineralização interna (ISOKAWA; KUBOTA; KUWAJIMA, 1970). Outros consideram

que as ETfs, ainda que de configuração tubular semelhante a dos POs, são de origem extracelular. Sugerem, ainda, que as ETfs se originam da LL (THOMAS, 1984; THOMAS; CARELLA, 1984; MUYLLE; SIMOENS; LAUWERS, 2000; PAGAVINO; PACE; PIERLEONI, 1991; GORACCI et al., 1999; YOSHIYAMA et al., 1989, 1990, 1996).

Imagens vistas pela técnica de detecção dos elétrons refletidos (BSE) mostraram que a densidade mineral das ETfs e dos Cr é maior que a da DI e semelhante à da DP. Portanto, os Cr e ETfs mostraram eletrodensidades muito semelhantes entre si. Nos grupos HA e LCNC, estruturas sugestivas de POs apresentaram certa densidade mineral sugerindo, como dito anteriormente, que eles sofreram processo de mineralização de sua estrutura. A análise em BSE das amostras dos grupos HA, LCO, LCC e LCNC ratificam a impressão de que DP e ETfs, assim como os Crs, como sugeridas em M.E.V., são entidades independentes (**Figs. 19A, B e C**), embora se possa supor que atuem integradamente no processo de resposta do complexo dentinopulpar aos estímulos externos.

Nota-se, portanto, que existem diferentes padrões de substratos dentinários de acordo com os diferentes tipos de estímulos e agressão sofridos pelos dentes. Essas variações estão presentes em todos os dentes que receberão uma restauração. A problemática aparece quando o planejamento é a colocação de uma restauração adesiva, pois a variação estrutural da dentina impede a formação de uma camada híbrida homogênea em toda a extensão do preparo cavitário, influenciando, dessa forma, a resistência de união e, em algumas situações, a integridade marginal (PASHLEY et al., 2002). Dessa maneira, é importante que o cirurgião-dentista reconheça, compreenda e domine as técnicas quando diante dessas variações, pois o fenômeno da adesão é complexo e tecnicamente sensível, sofrendo influência regional do substrato dentinário e, conseqüentemente, do comportamento clínico das restaurações adesivas. Alguns estudos mostram que a força de união dos sistemas adesivos à dentina cariada (SAY, 2005; PASHLEY, 1997) e dentina de LCNC (YOSHIYAMA et al. 1996; 2004, TAY; PASHLEY, 2004) é muito menor quando comparada àquela da dentina normal. Estas diferenças estruturais interferem não somente na ação dos ácidos sobre a dentina, mas também na penetração dos monômeros resinosos nessa dentina desmineralizada (WANG et al., 2007). A infiltração do adesivo na dentina intratubular é dificultada pela presença de depósitos minerais nos TDs, pois são resistentes ao condicionamento ácido (MARSHALL JR et al., 2000, 2001). Os estudos laboratoriais normalmente são realizados em dentes hígidos, que não sofreram nenhum tipo de alteração morfológica, como esclerosamento dentinário, hipermineralização, formação de depósitos de cristais mineralizados no interior dos túbulos,

portanto, muito diferente da real condição dentinária encontrada clinicamente. Isso implica que as pesquisas deveriam estar voltadas para o desenvolvimento de novos materiais às diferentes estruturas dentinárias encontradas, patrocinando, talvez, métodos de adesão diferentes para cada variável.

6.3 DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DAS ESTRUTURAS DA DENTINA E DAS EITs.

É importante lembrar que o E.D.S., apesar de ser uma ferramenta importante na análise da dentina, apenas fornece dados semiquantitativos. Isso significa que uma margem de erro deve ser considerada, pois os valores nominais e percentuais são aproximados. Além disso, podem ocorrer interferências das estruturas circunjacentes à região que está sendo analisada.

Apesar de utilizarem ferramentas eletrônicas semelhantes (E.D.S.), não é possível estabelecer correlação exata com os dados encontrados na literatura em decorrência da grande variabilidade dos valores registrados. Análises dos compostos de Ca e P sintéticos apontam uma razão média de Ca/P de 1.40 (LeGEROS, 1991), aproximadamente, enquanto existem trabalhos que indicam, para estruturas mineralizadas biológicas, uma variação de 1.7 a 2.4, da mesma razão (GAENGLER, 1995). A média obtida nesse estudo, apesar de um pouco maior que a descrita na literatura, aproximou-se muito de 2.4. Os valores podem ser observados na **Tabela 5**.

A literatura aponta uma diferença significativa na relação Ca/P entre a dentina sadia e desmineralizada (ARNOLD et al., 2003). Entretanto essas diferenças não foram notadas neste trabalho, considerando a análise intergrupos, isto é, não houve diferença nessa relação entre os grupos LCC e LCO com os demais grupos. Em outro estudo, entretanto, Arnold et al. (2007), analisando dentina cariada, notaram não haver aumento do conteúdo de Ca e P nas regiões dentinárias translúcidas hipermineralizadas e desmineralizadas. A razão Ca/P também não foi estatisticamente significativa, apesar de levemente menor na dentina desmineralizada. Por outro lado, quando se considera a razão Ca/P nos dentes cariados (LCC), observa-se que existe uma sutil diferença entre a DP e a DI, sugerindo que nesses grupos a DP é mais susceptível à desmineralização (MARSHALL Jr, 1993). Houve uma diminuição de P, aumentando a relação Ca/P na DI e uma relação Ca/P menor na DP do mesmo grupo. Essa relação é consequência da perda de P, provavelmente porque este é o primeiro dos elementos

a ser dissolvido em meio ácido (LeGEROS, 1991). Os mesmos achados não foram observados com significância para o grupo LCO. Apesar de as lesões cariosas obtidas serem clinicamente semelhantes, pode-se pressupor que a mineralização dos dentes desse grupo se encontrava em uma fase mais avançada, como descrito por Frank e Voegel (1980). Esses autores notaram que os depósitos cristalinos em fase mais inicial eram de *whitlockite*, e os cristais em estágios mais avançados, apatita. ZAVGORODNIY et al. (2008) também notaram 2 tipos de cristais, o primeiro com elementos químicos muito semelhantes ao da apatita biológica, e o segundo com traços de Mg e Si em sua constituição, sugerindo sua natureza de *whitlockite*, supostamente mais resistentes à desmineralização.

Contudo, detectou-se certa variabilidade na concentração do Mg e do S intragrupos. Sabe-se, pela literatura pertinente ao tema, que a presença de átomos de Mg associado com o Ca e P em estruturas orgânicas sugere a existência de um composto mineral do grupo TCP, particularmente o β -TCMP, o *whitlockite* de natureza biológica (DACULSI et al., 1987). Na verdade, β -TCMP Mg-substituted - $(\text{Ca.Mg})_3 (\text{PO}_4)_2$. é identificado em dentina, mas não em esmalte, provavelmente porque a dentina possui maior proporção de Mg (1.11% em peso) do que este último (0.4% em peso) (DACULSI et al., 1987). Outra possibilidade é que, sob condições ácidas comuns ao processo de cárie, o fosfato di-cálcio di-hidratado (DCPD), inicialmente formado, pode hidrolisar-se em β -TCMP quando a razão Mg/Ca em solução é aumentada pela dissolução dos componentes minerais da dentina (DACULSI et al., 1987; LeGEROS, 1991). O Mg é isoelétrico (de mesmo potencial elétrico) com o Ca e, portanto, existe equilíbrio de cargas entre esses cristais. Traços de Mg estão sempre presentes no fluido dentinário e podem, pois, ser incorporados na estrutura de apatita (LARMAS, 2001), assim como na própria molécula do TCP.

Isso parece coincidir com os resultados obtidos neste estudo, onde a concentração do Mg foi maior nas ETfs das LCC, assim como nos cristais dos dentes com LCNC. Entre as ETfs, não houve diferença entre as composições químicas. Também foi possível notar maior concentração na DP e na DI no grupo ER, diferente dos grupos LCC, LCO e LCNC, estes com menor concentração. É interessante notar que, nos locais com processo de desmineralização pela ação dos ácidos bacterianos, o Mg mostrou-se presente, porém em menor quantidade. Diferentemente dos nossos resultados, outros estudos (DACULSI et al., 1987; ZAVGORODNIY et al., 2008) mostraram que, na dentina cariada, a DI possui elevada concentração de cristais de β -TCP Mg-substituto e apatita. A explicação possível para essa diferença é a grande variabilidade regional do padrão de desmineralização das lesões cariosas.

Portanto, a presença do Mg na dentina demonstra seu envolvimento no processo de biomineralização (ARNOLD et al. 2001). Com base na observação clínica e microscópica dessas estruturas, resultantes da presente investigação, a condição acima descrita pode ser extrapolada para qualquer outra situação que submeta a dentina exposta a regimes de baixo pH, como alterações na composição e pH da saliva, consumo de alimentos e líquidos ácidos, ou pelo metabolismo bacteriano. Tem sido demonstrado que os cristais de *whitlockite* obliteram completamente os TDs em lesões cariosas e é tido como um produto da reprecipitação da dentina dissolvida (DACULSI et al., 1987; ZAVGORODNIY et al., 2008). Consequentemente, os *whitlockites* têm baixa solubilidade ao pH crítico (<5.5) e possivelmente previnem a rápida desmineralização da dentina. Resultados de investigações anteriores reforçam essa hipótese, uma vez que as ETfs e os cristais permaneceram inalterados após o condicionamento com ácido fosfórico (YOSHIYAMA et al., 1996; AZRAK, 2003; CALABRIA et al., 2008).

Com relação ao S, os dados semiquantitativos mostram uma relação S/P mais acentuada na DI dos dentes com LCC. Esses valores foram apenas significativamente diferentes comparados aos dentes IJ na mesma estrutura dentinária. Essas proporções podem indicar que o S é um elemento cujas concentrações nas estruturas dentinárias passam a ser notadas a partir do momento em que os dentes iniciam o contato com estímulos próprios da cavidade bucal, particularmente a degradação dos tecidos decorrentes do metabolismo bacteriano. Exceto o trabalho de Yoshiyama et al. (1996), não há dados na literatura que expliquem, com clareza, a presença e as situações clínicas que envolvam o S nos processos de desmineralização e remineralização. Esses autores mencionam que, quando a dentina é tratada com ácido clorídrico, as concentrações de Ca e P podem ser comprometidas, produzindo maior proporção S/P devido à remoção do fosfato. Por comparação, situações clínicas que exponham os dentes a níveis de pH mais baixos, como por exemplo os dentes do grupo LCC e LCO, podem ser a causa da presença do S nas amostras. Na DP, a razão S/P dos dentes com LCC só pôde ser comparada à do dente HA. Esse mesmo tipo de raciocínio não se aplica à DP, uma vez que nesta última a proporção desse elemento não seguiu um padrão, provavelmente em decorrência do maior metabolismo existente na DP comparativamente à DI, mantendo a estabilidade das estruturas mineralizadas.

Quando se compara a concentração de S e razão S/P intragrupos, observa-se que o único que apresentou diferença entre suas estruturas foi o grupo LCNC. Não existe uma explicação para essa ocorrência. Mais uma vez, a literatura se baseia no trabalho de

Yoshiyama et al., 1996 e Veis et al., 1993 apud Yoshiyama et al., 1996. Segundo esses autores, a detecção deste elemento se deve também à presença de fosfoproteínas não colagênicas, ricas em S, presentes na superfície do colágeno com a finalidade de reduzir a lise das proteínas. Isso provavelmente explica porque os cristais apresentam menos S em sua constituição comparado às outras estruturas, principalmente à DI. Observa-se, também, que isso ocorre com a DP, o que pode explicar a maior resistência das ETfs à dissolução por ácidos, o qual facilmente dissolve a DP. Em trabalhos anteriores (YOSHIYAMA et al., 1996; AZRAK, 2003; CALABRIA et al., 2008), constatou-se que a desmineralização das amostras dissolve a DP, mas mantém intactas as ETfs, sugerindo um baixo grau de mineralização desta última. Este fato expõe uma contradição importante, pois as imagens em BSE contradizem a suposição de que essas ETfs sejam, pelo menos exclusivamente, inorgânicas, uma vez que o padrão de dispersão de elétrons indica uma estrutura hipermineralizada. O que se pode constatar, até o momento, é que tais ETfs são resultado de processos degenerativos avançados ligados à agressão da dentina exposta na cavidade bucal. Sua exata composição e origem ainda precisam ser investigadas.

Os resultados obtidos mostraram que os cristais dos dentes HA apresentaram concentração de Mg e razão Mg/P iguais aos do grupo com LCNC, demonstrando característica de cristais de *whitlockite*. Entretanto, Porter et al. (2005) mostraram que o mineral intratubular na dentina transparente, em dentes adultos hígidos, é a hidroxiapatita e que não houve evidência de β -TCP rico em Mg no interior dos TDs. No entanto, notaram uma diminuição no tamanho dos cristais na DI e relacionaram esse fato ao processo de desmineralização – reprecipitação.

Apesar do conhecimento das alterações morfológicas encontradas na dentina, algumas perguntas ainda não possuem resposta. Pode-se notar, portanto, que ainda não está claro o que são as reações biológicas e físico-químicas envolvidas nessas alterações da dentina, tanto morfológicas como químicas. Se tais depósitos cristalinos são resultado de um mecanismo de defesa ativo ou de um fenômeno de dissolução-reprecipitação fisiológico, ainda não se sabe (MARSHALL Jr. et al. 2001). Também não se sabe exatamente o que rege essas alterações: se são os POs, se realmente é a LL que coordena toda essa deposição mineral e como isso ocorre. Acredita-se que a mineralização da dentina é modulada por moléculas de proteínas e microestruturas da matriz extracelular (ARANA-CHAVEZ, MASSA, 2004). Sabe-se, entretanto, que essas deposições cristalinas são um meio de defesa para evitar que as agressões atinjam a parte vital do dente, a polpa. Portanto, acreditar que apenas a visualização

das estruturas dentinárias e de suas modificações é suficiente para entender essa tão complexa estrutura pode representar perder a oportunidade de melhor desvendar os mistérios que envolvem o complexo dentinopulpar. Este trabalho, que surgiu com a intenção de responder a muitas perguntas, gerou muitos novos questionamentos. Dessa forma, os estudos devem

7 Conclusões

7 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados:

1. A conformação microestrutural entre os grupos experimentais foi diferente, com exceção dos grupos IJ e HJ, HA e LCNC, e LCC e LCO, que foram semelhantes entre si.
 2. A composição química e proporção dos elementos encontrados foi semelhante nas diferentes dentinas, exceto para o Mg e S.
 3. Houve diferença morfológica apenas entre as superfícies vestibulares e linguais dos grupos com LCC.
 4. 4.1. A conformação estrutural dos depósitos minerais no interior dos TDs foi diferente entre os grupos experimentais.
 - 4.2. A natureza química das ETfs e dos cristais foi semelhante, variando apenas a concentração dos elementos.
-

Referências

REFERÊNCIAS

ABSI, E. G.; ADDY, M.; ADAMS, D. Dentine hypersensitivity. A study of the patency of dentinal tubules in sensitive and non-sensitive cervical dentine. **J Clin Periodontol**, v.14, p.280-284, 1987.

ANGKER, L. et al. Quantitative analysis of the mineral content of sound and carious primary dentine using BSE imaging. **Archs Oral Biol**, v.49, n.2, p.99-107, 2004.

ARANA-CHAVEZ, V. E.; MASSA, L. F. Odontoblasts: the cells forming and maintaining dentine. **Int J Biochem Cell Biol**, v.36, n.8, p.1367-73, 2004.

ARNOLD, W. H.; KONOPKA, S.; GAENGLER, P. Qualitative and quantitative assessment of intratubular dentin formation in human natural carious lesions. **Calcif Tissue Int**, v.69, p.268-273, 2001.

ARNOLD, W. H. et al. Morphological analysis and chemical content of natural dentin carious lesion zones. **Ann Anat**, v.185, p.419-424, 2003.

ARNOLD, W. H. et al. Micromorphological and micronanalytical characterization of stagnating and progressing root caries lesions. **Archs Oral Biol**, v.52, p.591-597, 2007.

AZRAK, M. A. **Estudo comparativo da morfologia dentinária cervical em dentes normais e dentes com lesão cervical não cariosa: estudo em M.E.V.** 2003. 163p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, Bauru, 2003.

BJØRNDAL, L.; THYLSTRUP, A. A structural analysis of approximal enamel caries lesions and subjacent dentin reactions. **Eur J Oral Sci**, v.103, n.1, p.25-31, 1995.

BJØRDAL, L.; DARVANN, T.; THYLSTRUP, A. A quantitative light microscopic study of the odontoblast and subodontoblastic reactions to active and arrested enamel caries without cavitation. **Caries Res**, v.32, p.59-69, 1998.

BJØRDAL, L.; DARVAN, T. A light microscopic study of odontoblastic and non-odontoblastic cells involved in tertiary dentinogenesis. **Caries Res**, v.33, p.50-60, 1999.

BJØRNDAL, L.; MJÖR, I.A. Pulp–dentin biology in restorative dentistry. Part 4: Dental caries – characteristics of lesions and pulpal reactions. **Quintessence Int**, v.32, n.9, p.717–736, 2001.

BLAKE, G. C. The peritubular translucent zones in human dentin. **Brit Dent J**, v.104, p.57-64, 1958.

BRADFORD, E. W. The identity of Thomes' fibre. **Brit Dent J**, v.89, p.203-209, Nov. 1950.

BRADFORD, E. W. The maturation of the dentine. **Brit Dent J**, v.105, p.212-216, 1958.

BRÄNNSTRÖM, M. The elicitation of pain in human dentin and pulpa by chemical stimuli. *Arch Oral Biol*, v.7, p.79, 1962 apud BRÄNNSTRÖM, M.; ÄSTROM, A. The hydrodynamics of the dentine; its possible relationship to dentinal pain. **Int Dent J**, v.22, n.2, p.219-227, 1972.

BRÄNNSTRÖM, M.; JOHNSON, G.; NORDENVALL, K-J. Transmission and control of dentinal pain: resin impregnation for the desensitization of dentin. **JADA**, v.99, p.612-618, Oct. 1979.

BRÄNNSTRÖM, M.; GARBEROGLIO, R. Occlusion of dentinal tubules under superficial attrited dentine. **Swed Dent J**, v.4, p.87-91, 1980.

BRESCHI, L. et al. Field emission in-lens SEM study of enamel and dentin. **J Biomed Mater Res**, v. 46, p.315-323, 1999.

BUTLER, W. T. Dentin extracellular matrix and dentinogenesis. **Oper Dent**, p.18-23, 1992. Supplement 5.

BUTLER, W. T. The nature and functional significance of dentin extracellular matrix proteins. **Int J Dev Biol**, v.39, p.169-79, 1995.

CALABRIA M. P. et al. SEM analysis of dentin intratubular structures in non-carious cervical lesions. Abstract (2078). Trabalho apresentado **IADR 2008**.

CARDA, C.; PEYDRÓ, A. Ultrastructural patterns of human dentinal tubules, odontoblasts processes and nerve fibres. **Tissue and Cell**, v.38, p.141-150, Jan. 2006.

CARVALHO R. M. et al. Dimensional changes of demineralized human dentine during preparation for scanning electron microscopy. **Archs Oral Biol**, v.41, n.4, p.379-386, 1996.

CERUTI, P. et al. Non carious cervical lesions. A review. **Minerva Stomatol**, v.55, n.1-2, p.43-57, 2006.

COLEMAN, T. A.; GRIPPO, J. O.; KINDERKNECHT, K.E. Cervical dentin hypersensitivity. Part II: Associations with abfraction lesions. **Quintessence Int**, v.31, n.7, p.466-473, 2000.

COSTA, C. A. S.; MESAS, A. N.; HEBLING, J. Pulp response to direct capping with an adhesive system. **Am J Dent**, v.13, n.2, p.81-86, Apr. 2000.

DAI, X. F., TEN CATE, A. R., LIMEBACK, H. The extent and distribution of intra tubular collagen fibrils in human dentin. **Arch Oral Biol**, v.36, p.775-776, 1991.

DACULSI, G. et al. Qualitative and quantitative data on arrested caries in dentine. **Caries Res**, v.13, p.190-202, 1979.

DACULSI, G. et al. Possible physico-chemical processes in human dentin caries. **J Dent Res**, v.66, n.8, p.1356-1359, Aug. 1987.

DRIESSENS, F. C. M.; VERBEECK, R. M. H. Biominerals. Boca Raton, FL: CRC Press, p.163-178, 1990 apud MARSHALL JÚNIOR., G. W. Dentin: Microstructure and characterization. **Quintessence Int**, v.24, n.9, p.606-616, 1993.

DUKE, E. S.; LINDEMUTH, J. Variability of clinical dentin substrates. **Am J Dent**, v.4, n.5, p.241-246, Oct. 1991.

EDWARDS, M. et al. Buffering capacities of soft drinks: the potential influence on dental erosion. **J Oral Rehab**, v.26, p.923-927, 1999.

ERAMO, S. et al. Aspetti istopatologici e terapeutici delle lesioni cervicali. **Minerva Stomatol**, v.52, n.1-2, p.69-74, 2003.

FOX, L. T.; SENIA, E. S.; ZEAGLER, J. Another look at the odontoblast process. **J Endod**, v.10, n.11, p.538-543, Nov. 1984.

FRANK. R. M. Electron microscopy of undecalcified sections of human adult dentine. **Archs Oral Biol**, v.1, p.29-32, 1959.

FRANK. R. M. Attachment sites between the odontoblast process and intradentinal nerve fibre. **Archs Oral Biol**, v.13, p.833-834, 1968.

FRANK. R. M.; VOEGEL, J. C. Ultrastructure of the human odontoblast process and its mineralization during dental caries. **Caries Res**, v.14, p.367-380, 1980.

FRANK. R. M.; STEUER, P. Transmission electron microscopy of the human odontoblast process in peripheral root dentine. **Archs Oral Biol**, v.33, n.2, p. 91-98, 1988.

FRANK. R. M. Ultrastructure of human dentine 40 years ago- progress and perspectives. **Archs Oral Biol**, v.44, p.979-984, 1999.

GALLIEN, K. S.; KAPLAN, I. K.; OWENS, B. M. A review of noncarious dental cervical lesions. **Comp Cont Educ Dent**, v.15, n.11, p.1366-1372, Nov. 1994.

GARBEROGLIO, R.; BRÄNNSTRÖM, M. Scanning electron microscopic investigation of human dentinal tubules. **Archs Oral Biol**, v.21, p.355-362, 1976.

GIACHETTI, L. et al. Dentina sclerotica: ipotesi eziopatogenetiche. **Minerva Stomatol**, v.51, n.7-8, p.285-292, 2002.

GOLDBERG, M. et al. Dental mineralization. **Int J Develop Biol**, p.39:93, 1995.

GORACCI, G. et al. Analisi ultrastrutturale della dentina peritubulare e del lume tubulare di denti sani. **Minerva Stomatol**, v.42, n.5, p.205-216, 1993.

GORACCI, G.; MORI, F. Aspetti micromorfologici della dentina. **Minerva Stomatol**, v.44, n.9, p.377-387, 1995.

GORACCI, G. et al. Extent of the odontoblastic process: Analysis by SEM and confocal microscopy. **Minerva Stomatol**, v.48, p.1-8, 1999.

GORACCI, G.; MORI, F.; BALDI, M. Terminal end of the human odontoblast process: a study using SEM and confocal microscopy. **Clin Oral Invest**, v.3, p.126-132, 1999.

GRIPPO, J. O. Abfraction: a new classification of hard tissue lesions of teeth. **J Esthet Dent**, v.3, p.14-19, 1991.

GRÖTZ, K. A. et al. Histotomography of the odontoblast processes at the dentine-enamel junction of permanent healthy human teeth in the confocal laser scanning microscope. **Clin Oral Invest**, v.2, p.21-25, 1998.

GRÖTZ, K. A. et al. Terminal end of the human odontoblast processes. **Clin Oral Invest**, v.4, p.106-107, 2000. Letter.

GRÖTZ, K. A.; AL-NAWAS, B.; DUSCHNER, H. Correlating micromorphology of the pulp odontoblast seam using confocal laser scanning microscopy and dark field microscopy. **Clin Oral Invest**, v.7, p.59-61, 2003.

GWINNETT, A. J.; JENDRESEN, M. D. Micromorphologic features of cervical erosion after acid conditioning and its relation with composite resin. **J Dent Res**, v.57, n.4, p.543-549, Apr. 1978.

HAWKINSON, R. W.; EISENMANN, D. R. Electron Microscopy of dentinal tubule sclerosis in the enamel-free region of the rat molar. **Archs Oral Biol**, v.28, n.5, p.409-414, 1983.

HOLLAND, G. Morphological features of dentin and pulp related to dentin sensitivity. **Arch Oral Biol**, v.39, suppl, 3S, 11S.

INOUE, H. et al. Ultrastructural relation between nerve terminals and dentin bridge formation after pulpotomy in human teeth. *Archs Oral Biol*, v.40, p.669-675, 1995.

ISOKAWA, S.; TODA, Y.; KUBOTA, K. A scanning electron microscopic observation of etched human peritubular dentine. *Archs Oral Biol*, v.15, p.1303-1306, 1970.

ISOKAWA, S.; KUBOTA, K.; KUWAJIMA, K. Scanning electron microscope study of dentin exposed by contact facets and cervical abrasion. *J Dent Res*, v.52, n.1, p.170-174, Feb. 1973.

JOHANSEN, E.; PARKS, H. F. Electron-microscopic observations on sound human dentin. *Archs Oral Biol*, v.7, p.185-193, 1962.

KAWASAKI, K. et al. Relationship between mineral distributions in dentine lesions and subsequent remineralization in vitro. *Caries Res*, v.34, p. 395-403, 2000.

KELLEY, K. W.; BERGENHOLTZ, G.; COX, C. F. The extent of the odontoblast process in rhesus monkeys (*Macaca mullata*) as observed by scanning electron microscopy. *Archs Oral Biol*, v.26, p.893-897, 1981.

KINNEY, J. H. et al. Mineral distribution and dimensional changes in human dentin during demineralization. *J Dent Res*, v.74, p.1179-1184, 1995.

KITAJIMA, E. W.; LEITE, B. **Curso Introdotório de Microscopia Eletrônica de Varredura**. 2nd ed. São Paulo – Piracicaba. 1999. 46 p.

KWONG S. M. et al. An ultrastructural study of the application of dentine adhesives to acid-conditioned sclerotic dentin. *J Dent*, v.28, p.515-528, 2000.

LARMAS, M. Odontoblast function seen as the response of dentinal tissue to dental caries. *Adv Dental Res*, v.15, p.68-71, 2001.

LEE, W. C.; EAKLE, W. S. Stress-induced cervical lesions: Review of advances in the past 10 years. *J Prostet Dent*, v.75, n.5, p.487-493, May. 1996.

LEFÈVRE, R.; FRANK, R. M.; VOEGEL, J. C. The study of human dentine with secondary ion microscopy and electron diffraction. **Calc Tissue Res**, v.19, p.251-261, 1976.

LeGEROS, R. Z. **Calcium phosphates in oral biology and medicine**: Monographs in Oral Sciences. San Francisco: Ed. Howard M. Myers. 1991. v.15.

LEVITCH, L. C. et al. Non-carious cervical lesions. **J Dent**, v.22, p.195-207, 1994.

LITONJUA, L. A. et al. Noncarious cervical lesions and abfractions: a re-evaluation. **JADA**, v.134, p.845-850, July 2003.

LOPES M. M.; PERDIGÃO J.; GERALDELI, S. **Processing biological specimens for SEM and TEM**: Mini-Residence in Operative Dentistry and Dental Materials. University of Minnesota, School of Dentistry, USA, 2002.

LOPES, G. C. et al. Bonding to cervical sclerotic dentin: Effect of acid etching time. **J Adhes Dent**, v.6, n.1, p.19-23, 2004.

MANIATOPOULOS, C.; SMITH, D. C. A scanning electron microscopic study of the odontoblast process in human coronal dentine. **Archs Oral Biol**, v.28, n.8, p.701-710, 1983.

MARSHALL JÚNIOR., G. W. Dentin: Microstructure and characterization. **Quintessence Int**, v.24, n.9, p.606-616, 1993.

MARSHALL JR., G. W. et al. The dentin substrate: structure and properties related to bonding. **J Dent**, v.25, n.6, p.441-458, Jul. 1997.

MARSHALL JR., G. W. et al. Citric acid etching of cervical sclerotic dentin lesion: An AFM study. **J Biomed Mater Res**, v.39, p.338-344, 2000.

MARSHALL JR., G. W. et al. Demineralization of caries-affected transparent dentin by citric acid: an atomic force microscopy study. **Dent Mat**, v.17, p.45-52, 2001.

MAYHEW, R. B.; JESSEE, S. A.; MARTIN, R. E. Association of occlusal, periodontal, and dietary factors with the presence of non-carious cervical dental lesions. **Am J Dent**, v.11, n.1, p.29-32, Feb. 1998.

MEERBEEK, B. V. et al. Morphological characterization of the interface between resin and sclerotic dentin. **J Dent**, v.22, p.141-146, 1994.

MENDIS, B. R.; DARLING, A. I. A scanning electron microscope and microradiographic study of closure of human coronal dentinal tubules related to occlusal attrition and caries. **Archs Oral Biol**, v.24, p.725-733, 1979.

MILLER, J. The micro-radiographic appearance of dentine. **Brit Dent J**, v.97, n. ¼ , p.7-9, July 1954.

MIXSON, J. M. et al. Surface morphology and chemical characterization of abrasion/erosion lesions. **Am J Dent**, v.8, n.1, p.5-9, Feb. 1995.

MJÖR, I. A.; FEJERSKOV, O. Dentin-predentin complex and its permeability: Pathology and treatment overview. **J Dent Res**, v.64, p.621-627, 1985. Special issue.

MJÖR, I. A.; NORDAHL, I. The density and branching of dentinal tubules in human teeth. **Archs Oral Biol**, v.41, n.5, p.401-412, 1996.

MJÖR, I. A.; HEYERAAS, K. J. Pulp-dentin biology in restorative dentistry. Part 1: Normal structure and physiology. **Quintessence Int**, v.32, p.427-446, Jan.-June 2001.

MJÖR, I. A. Pulp-Dentin Biology in Restorative Dentistry. **Quintessence Books**, 2002.

MONDELLI, J. et al. Influence of cavity liners on the penetration of dentin by zinc phosphate cement component on marginal fit and retention of cemented crowns. **Estomat Cult**, v. 1401, n. 2, p. 173-81, July/Dec, 1976.

MONDELLI, J. et al. **Proteção do Complexo Dentinopulpar**. São Paulo: Ed. Artes Médicas Ltda. v.1, 1998.

MURRAY, P. E. et al. Odontoblast morphology and dental repair. **J Dent**, v.31, n.01, p.75-82, 2003.

MUYLLE, S.; SIMOENS, P.; LAUWERS, H. Tubular contents of equine dentin: a scanning electron microscopic study. **J Vet Med**, v. 47, p.321-330, 2000.

NGO, H. et al. Electron probe microanalysis and transverse microradiography studies of artificial lesions in enamel and dentin: a comparative study. **Adv Dent Res**, v.11, p.426-432, 1997.

OGAWA, K. et al. The ultrastructure and hardness of the transparent layer of human carious dentin. **J Dental Res**, v.62, p.7-10, 1983.

PAGAVINO, G.; PACE, R.; PIERLEONI, P. La lamina limitante. Aspetti al microscopio elettronico a scansione. **Minerva Stomatol**, v.40, p.455-465, 1991.

PASHLEY, D. H. Sensitivity of dentin to chemical stimuli. **Endod Dent Traumatol**, v.2, p.130-137, Mar. 1986.

PASHLEY, D. H. Dentin permeability, dentin sensitivity, and treatment through tubule occlusion. **J Endod**, v.12, n.10, p.465-474, Oct. 1986.

PASHLEY, D. H. Dynamics of the pulp-dentin complex. **Crit Rev Oral Biol Med**, v.7, n.2, p.104-133, 1996.

PASHLEY, D. H.; CARVALHO, R. M. Dentin permeability and dentin adhesion. **J Dent**, v.25, n. 5, p.355-372, 1997.

PASHLEY, D. H. et al. The effects of dentin permeability on restorative dentistry. **Dent Clin N Am**, v.46, p.211-245, 2002.

PEGORARO, L. F. et al. Noncarious cervical lesions in adults. Prevalence and occlusal aspects. **JADA**, v.136, Dec. 2005.

PEREIRA et al. Tratamentos conservadores da vitalidade pulpar: Princípios biológicos. **Revista Biodonto**.v.2, n.3, maio/junho, 2004.

PORTER, A. E. et al. A transmission electron microscopy study of mineralization in age-induced transparent dentin. **Biomater**, v.26, p.7650-7660, 2005.

RIMONDINI, L.; CHIARA, B.; CARRASSI, A. Ultrastructure of hypersensitive and non-sensitive dentine. A Study on replica models. **J Clin Periodontol**, v.22, n.2, p.899-902, July-Dec. 1995.

SAY, E. C. et al. Bonding to sound vs. caries-affected dentin using photo-and dual cure adhesives. **Oper Dent**, v.30, n.1, p.90-98, 2005.

SAKOOLNAMARKA, R.; BURROW, M. F.; PRAWER, S.; TYAS, M. J. Micromorphological investigation of noncarious lesions treated with demineralizing agents. **J Adhes Dent**, v.2, n.4, p.279-287, 2000.

SAKOOLNAMARKA, R.; BURROW, M. F.; PRAWER, S.; TYAS, M. J. Raman spectroscopic study of noncarious cervical lesions. **Odontology**, v. 93, n.1, p.35-40, 2005.

SCHROEDER, L.; FRANK, R. M. High-resolution transmission electron microscopy of adult human peritubular dentine. **Cell Tissue Res**, v.242, p.449-451, 1985.

SIGAL, M. J.; CHERNECHY, R. Terminal end of the odontoblast process. **J Endod**, v. 14, n.11, p.543-545, Nov. 1988.

STANLEY, H. R. et al. The detection and prevalence of reactive and physiologic dentin, reparative dentin and dead tracts beneath various types of dental lesions according to tooth surface and age. **J Pathol**, v.12, n.4, p.257-289, 1983.

SZABÓ, J.; TROMBITÁS, K.; SZABÓ, I. The odontoblast process and its branches in human teeth observed by scanning electron microscopy. **Archs Oral Biol**, v. 29, n. 4, p. 331-333, 1984.

SZABÓ, J.; TROMBITÁS, K.; SZABÓ, I. Scanning Electron Microscopy of walls of tubules in human coronal dentin. **Archs Oral Biol**, v. 30, n. 10, p. 705-710, 1985.

SZABÓ, J.; TROMBITÁS, K.; SZABÓ, I. Scanning electron microscopy of the walls of tubules in human coronal dentine. **Archs Oral Biol**, v. 30, n. 10, p. 705-710, 1985.

TAGAMI, J. et al. Effect of aging and caries on dentin permeability. **Proc Finn Dent Soc**, v.88, p.149-154, 1992.

TAY, F. R.; PASHLEY, D. H. Resin bonding to cervical sclerotic dentin: A review. **J Dent**, v. 32, n.3, p. 173-196, 2004.

TEN CATE, A. R. Dentin-pulp complex in: **Oral histology**: development, structure, and function. 7th ed. St. Louis, Mo: Mosby Elsevier, c2008. p. 411.

THOMAS, H. F. The extent of odontoblast process in human dentin. **J Dent Res**, v.58, p.2207-2219, 1979.

THOMAS, H. F. The effect of various fixatives on the extent of the odontoblasto process in human dentine. **Archs Oral Biol**, v.28, n.5, p.465-469, 1983.

THOMAS, H. F.; CARELLA, P. A scanning electron microscope study of dentinal from unerupted human teeth. **Archs Oral Biol**, v.28, n.12, p.1125-1130, 1983.

THOMAS, H. F.; CARELLA, P. Correlation of scanning and transmission electron microscopy of human dentinal tubules. **Archs Oral Biol**, v.29, n.8, p.641-646, 1984.

THOMAS, H. F. The lamina limitans of human dentinal tubules. **J Dent Res**, v.63, n.8, p.1064-1066, Aug. 1984.

TJADERHANE, L.; HIETALA, E. L.; LARMAS, M. Mineral element analysis of carious and sound rat dentin by electron probe microanalyzer combined with back-scattered electron image. **J Dent Res**, v.74, p.1770-1774, 1995.

VASILADIS, L.; DARLING, A. I.; LEVERS, G.H. The histology of sclerotic humans root dentine. **Archs Oral Biol**, v. 28, n.8, p.693-700, 1983.

VEIS, A. Mineral-matrix interaction in bone and dentin. *J Bone Min Res*, v.8, Suppl 2, p.5493-5497, 1993 apud YOSHIYAMA, M. et al. Morphological characterization of tube-like structures in hypersensitive human radicular dentine. **J Dent**, v.24, n.1-2, p.57-63, 1996.

VERBEECK, R. M. H.; De BRUYNE, P. A.M. The solubility behavior of whitlockite at 25°C (Abstract). **J Dent Res**, v.68, p.1086, 1989.

WANG, Y.; SPENCER, P.; WALKER, M. P. Chemical profile of adhesive/caries-affected dentin interfaces using Raman microscopy. **J Biomed Mater Res**, v.81A, p.279-286, 2007.

WEBER, D. F. Human dentin scleroris: A microradiographic survey. **Archs Oral Biol**, v.19, p. 163-169, 1974.

WEINER S. et al. Peritubular dentin formation: crystal organization and the macromolecular constituents in human teeth. **J Struct Biol**, v.126, p.27-41, 1999.

YOSHIBA, K. et al. Odontoblast process in human dentin revealed by fluorescence labeling and transmission electron microscopy. **Histochem Cell Biol**, v.118, p.205-212, 2002.

YOSHIYAMA, M. et al. Scanning electron microscopic characterization of sensitive vs. insensitive radicular dentin. **J Dent Res**, v.68, n.11, p.1498-1502, Nov. 1989.

YOSHIYAMA, M. et al. Transmission electron microscopic characterization of hypersensitive human radicular dentin. **J Dent Res**, v.69, n.6, p.1293-1297, June 1990.

YOSHIYAMA, M. et al. Morphological characterization of tube-like structures in hypersensitive human radicular dentine. **J Dent**, v.24, n.1-2, p.57-63, 1996.

YOSHIYAMA, M. et al. Bonding ability of adhesive resins to caries-affected and caries-infected dentin. **J Appl Oral Sci**, v.12, n.3, p.171-176, 2004.

ZAVGORODNIY, A. V. et al. Ultrastructural observations and growth of occluding crystals in carious dentine. **Acta Biomater**, v.2, p.1427-1439, 2008.

ZAVGORODNIY, A. V.; ROHANIZADEH, R.; SWAIN, M. V. Ultrastructure of dentine carious lesions. **Archs Oral Biol**, v.53, p.124-132, 2008.

Anexos

Anexo A – Declaração de doação dos dentes pelo paciente.

Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru

Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 – Bauru-SP – CEP 17012-901 – C.P. 73
 PABX (0XX14)3235-8000 – FAX (0XX14)3223-4679

DECLARAÇÃO DE DOAÇÃO DE DENTES

Senhor(a) doador(a) ou seu representante legal,

A Faculdade de Odontologia de Bauru, da Universidade de São Paulo, desenvolve pesquisas que requerem a utilização de dentes 3º molares humanos inclusos hígidos, dentes hígidos jovem e adulto com indicação de extração ortodôntica, dentes cariados e dentes com lesão cervical não cariosa (dente com recessão na gengiva ou cavidade sem cárie próxima à gengiva) extraídos. Desta forma, quando ocorrer, após análise clínica e realização do seu plano de tratamento, a necessidade de extrair (arrancar) um ou mais dentes, solicitamos que o(a) senhor(a) faça a doação do(s) seu(s) dente(s) ou dos dentes do paciente de quem é representante legal. Esta doação não é obrigatória. É assegurado ao doador(a) que seu nome não será divulgado. Caso não queira fazer a doação não será excluído (retirado) do tratamento para o qual foi triado anteriormente. Também, a doação não dará ao doador(a) qualquer prioridade em tratamentos futuros, na Faculdade de Odontologia de Bauru (USP).

Declaro, portanto, ter sido esclarecido sobre quais os motivos que levaram a necessidade de remoção do(s) dente(s) _____ (código) e concordo que os mesmos sejam utilizados na pesquisa de título “Microestrutura da dentina observada sob diferentes condições clínicas empregando-se microscopia eletrônica e EDX”, que objetiva observar alterações que ocorrem em dentes com diferentes tipos de dentina afetada por diferentes lesões, através da análise de suas estruturas internas, da composição química e elemental, com diferentes microscópios (instrumentos que aumentam o tamanho das imagens das estruturas que serão analisadas). Fui, ainda, esclarecido pelo pesquisador que minha identidade não será divulgada por qualquer meio e que o material recolhido será utilizado unicamente para a presente pesquisa.

Identificação do doador:

Nome (legível): _____
 Data de nascimento: ____/____/____ Local de nascimento: _____
 UF: _____
 RG nº: _____ CPF nº: _____
 Endereço (Rua ou Avenida, nº, Bairro e Complemento): _____
 Cidade: _____ UF: _____ CEP: _____
 Telefones para contato: (____) _____; (____) _____
 e-mail: _____

Bauru, ____ de ____ de ____.

Anexo B – Termo de doação de dentes humanos por cirurgiões-dentistas.

Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru
Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 – Bauru-SP – CEP 17012-901 – C.P. 73
PABX (0XX14)3235-8000 – FAX (0XX14)3223-4679

TERMO DE DOAÇÃO DE DENTES HUMANOS POR CIRURGIÕES-DENTISTAS

Eu, _____, Cirurgião(ã)-
dentista, inscrito no CRO sob o número _____, com consultório situado à
_____, no bairro _____,
na cidade de _____, UF _____, CEP _____, telefone
_____, dão _____ dentes para a Faculdade de Odontologia de Bauru, da
Universidade de São Paulo, a fim de contribuir para a realização da pesquisa intitulada:
“Microestrutura da dentina observada sob diferentes condições clínicas empregando-se
microscopia eletrônica e EDX.”, de autoria de MARCELA PAGANI CALABRIA e PROF.
DR. JOSÉ CARLOS PEREIRA. Declaro que estes dentes foram extraídos por indicação
terapêutica, cujos históricos fazem parte dos prontuários dos pacientes de quem se originam,
arquivados sob minha responsabilidade. Estou ciente de que o material recolhido será
utilizado pelos pesquisadores desta Faculdade unicamente para a realização da presente
pesquisa.

_____, _____ de _____ de _____

Anexo C – Aprovação do Projeto de Pesquisa pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Bauru-USP, sob o processo nº 183/2009.

Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru
Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 – Bauru-SP – CEP 17012-901 – C.P. 73
PABX (0XX14)3235-8000 – FAX (0XX14)3223-4679

Comitê de Ética em Pesquisa (14)3235-8356
mferrari@fob.usp.br

Processo nº 183/2009

Bauru, 03 de março de 2010.

Senhor Professor,

Informamos que após o envio da documentação solicitada referente ao projeto de pesquisa encaminhado a este Comitê de Ética em Pesquisa **"MICROESTRUTURA DA DENTINA OBSERVADA SOB DIFERENTES CONDIÇÕES CLÍNICAS EMPREGANDO-SE MICROSCOPIA ELETRÔNICA E EDX"** de autoria de Marcela Pagani Calabria, sob sua orientação, foi novamente analisado e considerado **APROVADO** por este Colegiado, em reunião realizada no dia **24 de fevereiro de 2010**.

Solicitamos que ao término do trabalho, seja enviado a este Comitê um relatório final para novo parecer, o qual será utilizado para publicação científica.

Atenciosamente,

Profª Drª Maria Teresa Atta
Coordenadora

Prof. Dr. José Carlos Pereira
Docente do Departamento de Dentística, Endodontia e Materiais Dentários