



CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO, PESQUISA E EXTENSÃO  
CURSO DE MESTRADO EM ODONTOLOGIA  
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM DENTÍSTICA

**AVALIAÇÃO ULTRA-MORFOLÓGICA DA MINERALIZAÇÃO  
E REMINERALIZAÇÃO DENTINÁRIA  
*IN VIVO*: UM ESTUDO PRELIMINAR EM HUMANOS**

**MARCOS KIRIHATA**

1º Orientador: Prof. Dr. André Figueiredo Reis  
2º Orientador: Profa. Dra. Cristiane Mariote Amaral

GUARULHOS  
2006



**MARCOS KIRIHATA**

**AVALIAÇÃO ULTRA-MORFOLÓGICA DA MINERALIZAÇÃO  
E REMINERALIZAÇÃO DENTINÁRIA  
*IN VIVO*: UM ESTUDO PRELIMINAR EM HUMANOS**

Dissertação apresentada à Universidade Guarulhos  
para obtenção do título de Mestre em Odontologia,  
Área de Concentração em Dentística.

1º Orientador: Prof. Dr. André Figueiredo Reis  
2º Orientador: Profa. Dra. Cristiane Mariote Amaral

GUARULHOS  
2006

**Ficha catalográfica**  
**Elaborada pela Biblioteca Central da Universidade Guarulhos**

**K65a**

Kirihata, Marcos

Avaliação ultra-morfológica da mineralização e remineralização dentinária *in vivo*: um estudo preliminar em humanos. / Marcos Kirihata — Guarulhos, SP: Universidade Guarulhos, 2006.

xi ; 54 p. : il. ; 30 cm

1 - Orientador: Prof. Dr. André Figueiredo Reis

2 - Orientador: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup>. Cristiane Mariote Amaral  
Dissertação (Mestrado) – Universidade Guarulhos.

1. Dentina. 2. Camada híbrida. 3. Mineralização

CDD 21.ed. 617.634

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a todos os meus familiares, em especial, aos meus pais, Hitoshi e Teresa, pelo incentivo a continuar estudando e pelos exemplos de excelentes professores que sempre foram, principalmente na vida.

À minha esposa Vivian, pela compreensão nos momentos difíceis, sempre me dando o apoio e o amor que foram essenciais para a concretização desse trabalho.

Aos meus amigos, por compreender a ausência em alguns compromissos sociais.

## **AGRADECIMENTOS**

À Universidade Guarulhos, por permitir condições satisfatórias para a concretização do Curso de Mestrado em Odontologia.

À Profa. Dra. Magda Feres, coordenadora do Programa de Mestrado em Odontologia da Universidade Guarulhos, pela eficiência e perseverança na busca do melhor na condução de todo o curso.

Ao Prof. Dr. Saulo Geraldeli, pelo despertar de um sentimento de pesquisa, incentivando sempre a produção de trabalhos científicos; por aperfeiçoar os conhecimentos clínicos, tanto na área de Dentística, como na área de Periodontia e Cirurgia, além do relacionamento interpessoal com o paciente; e por ser essa pessoa tão inteligente e humilde que sempre demonstrou ser. Muito Obrigado, Saulo, essas coisas nunca serão esquecidas. Te considero muito, não só pela ajuda na pesquisa, mas o mais importante, como um grande amigo.

Ao Prof. Dr. André Reis, que demonstrou ser uma pessoa muito dedicada em tudo o que se propõe a realizar e que não mediu esforços para que esse trabalho fosse concluído, apesar de não estar desde o início do projeto. Muito obrigado, André, seus ensinamentos foram fundamentais para o meu aprimoramento profissional.

A todos os Professores do Mestrado, principalmente à Profa. Dra. Cristiane Mariote Amaral e ao Prof. Dr. José Augusto Rodrigues, da disciplina de Dentística, os quais eu tive um maior contato, pela amizade estabelecida e por passarem seus conhecimentos em diversos assuntos. Acredito que poderei sempre contar com vocês, e a recíproca é verdadeira.

Ao Prof. Dr. Roberto R. Braga, do departamento de Materiais Dentários da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo por nos permitir a utilização da cortadeira metalográfica de precisão.

Ao Prof. Elliot Watanabe Kitajima, do NAP/MEPA – ESALQ/USP, onde foram realizadas as análises microscópicas.

Ao Prof. Dr. Marcelo Giannini, da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, por fornecer o material utilizado na microscopia.

Aos profissionais do Curso de Especialização em Ortodontia da Universidade Guarulhos pela indicação de pacientes para a realização da pesquisa.

Aos meus pais e familiares, pela ajuda e compreensão nos momentos de ausência. Em nenhum momento, surgiram críticas a respeito da realização do curso e isso foi fundamental para que desse tudo certo. Ao contrário, os elogios foram fundamentais para que se conseguisse alcançar o objetivo final.

À minha esposa Vivian, pela força, pelo carinho e principalmente pela compreensão dedicada nesse período, que para mim passaram tão rápidos, mas para ela, pareciam não ter fim. Obrigado Vi, tenho a cada dia mais certeza do nosso amor, e quem sabe, agora, poder compartilhar esse amor com um “japinha”... ou uma “japinha”... Essa vitória é mais uma das nossas conquistas!

Ao meu amigo Adriano Sapata, pelo incentivo em iniciar o curso e sempre ajudar nas horas necessárias. A partir das suas qualidades como cirurgião-dentista, e como pessoa, tive forças para continuar e me espelhar em um ótimo profissional.

Aos meus amigos professores Cláudio Sato e Marcelo Witzel, os quais eu tive a oportunidade de conviver mais nesse período, pelas inúmeras demonstrações de conhecimento, que acabam sempre incentivando os estudos na área.

Ao Prof. Carlos E. Francci, pela humildade em permitir que eu faça parte de sua equipe (Grupo Free) e por todos os seus ensinamentos. Valeu Carlos!

A todo o Grupo Free, que compartilharam as dificuldades e as “correrias” nesse período do curso.

Aos pacientes, que foram fundamentais para a realização deste trabalho. Foi muito legal saber que existem pessoas que se preocupam com a ciência da odontologia, dedicando parte do seu tempo para servir como voluntários em pesquisas. A partir deles, novas descobertas são realizadas em benefícios da profissão.

Aos meus amigos da Prefeitura Municipal de Guarulhos e da Prefeitura Municipal de Itaquaquecetuba pela compreensão nos dias de ausência e incentivo para a continuação dos estudos. Muito obrigado pelos atendimentos de urgência, os pacientes com certeza, também ficaram gratos.

Aos meus amigos do Curso de Mestrado, pela ajuda nos trabalhos, pelo respeito e principalmente pela amizade iniciada nesse período. Nós conseguimos, nós merecemos, valeu o esforço, sensação de vitória. Espero não perder o contato.

À Cíntia, Adriana, Fernanda e Cristina, pelo auxílio tanto na clínica, como na parte administrativa do curso.

Às chefias das unidades as quais trabalho, pela colaboração em entender a importância dos estudos. Um agradecimento especial ao Dr. Lincoln, Dra. Elisabeth, Dra. Valéria e ao Diretor José João.

Ao Pastor Cosme, da Igreja Avivamento Bíblico, saiba que eu pensava sempre em sua pessoa e nas suas orações nos momentos difíceis, para que pudesse concluir esse trabalho.

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

A DEUS, presença constante em minha vida, por permitir a concretização desse trabalho e com saúde, que é o mais importante. Louvo a Deus por mais essa conquista.

“ Porque Deus amou tanto o mundo que deu o seu Filho Unigênito, para que todo o que nele crer não pereça, mas tenha a vida eterna”.

João 3.16.

## RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar *in vivo* a hipótese de que há um processo de remineralização na região dentinária desmineralizada para formação da camada híbrida após um período de 6 meses. Foram selecionados 2 dentes pré-molares em pacientes com indicação para extração por razões ortodônticas. Cada dente recebeu dois preparos Classe I, sendo um na fóssula mesial e outro na distal, com um intervalo de 6 meses entre os dois preparos. Os preparos foram confeccionados com pontas diamantadas e apresentavam as seguintes dimensões: 3mm de profundidade, 3mm no sentido vestibulo-lingual e 2mm no sentido mesio-distal. As cavidades foram condicionadas com ácido fosfórico a 37% por 20s, em seguida aplicou-se o sistema adesivo Prime&Bond NT (Dentsply), uma camada do compósito de baixa viscosidade Protect Liner F (Kuraray Medical) e a resina composta Esthet-X (Dentsply) de acordo com as recomendações dos fabricantes. Após a exodontia, os dentes foram seccionados em fatias de aproximadamente 1mm de espessura no sentido mesio-distal. Os espécimes foram então preparados para microscopia eletrônica de transmissão. Fatias mineralizadas não-contrastadas de aproximadamente 90nm de espessura foram observadas em um microscópio eletrônico de transmissão. As imagens demonstraram evidências de que existe um processo de remineralização na interface resina-dentina produzida pelo sistema adesivo Prime&Bond NT, após um período de 6 meses.

**Palavras Chave:** Dentina, camada híbrida, remineralização, microscopia eletrônica de transmissão, *in vivo*.

## ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate *in vivo* the hypothesis that there is a remineralization process in the dentin region that is demineralized for hybrid layer formation after 6 months. Two premolars that were indicated for extraction for orthodontic treatment were used in this study. Two Class I cavity preparations were performed in each tooth, one in the mesial fossa and the other in the distal, with an interval of 6 months between each restoration. The cavity preparations were performed with diamond burs and presented the following dimensions: 3mm depth, 3mm buccal-lingual, 2mm mesial-distal. The cavities were etched with 37% phosphoric acid for 20s, and the adhesive system Prime&Bond NT (Dentsply) was applied. Cavities were restored with a low-viscosity composite resin Protect Liner F (Kuraray Medical) and a microhybrid composite Esthet-X (Dentsply) according to manufacturers' instructions. After extraction, teeth were sectioned in slabs of approximately 1mm thickness in the mesial-distal direction. Specimens were then prepared for transmission electron microscopy. Mineralized unstained 90nm-thick sections were observed in a transmission electron microscope. Images revealed evidences of a remineralization process in the resin-dentin interface produced by the two-step etch-and-rinse adhesive Prime&Bond NT after a 6 month period.

**Keywords:** Dentin, hybrid layer, remineralization, transmission electron microscopy, *in vivo*.

**SUMÁRIO**

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	1
2. PROPOSIÇÃO.....	9
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	10
3.1. Aspectos Éticos.....	10
3.2. Amostra.....	10
3.3. Delineamento Experimental.....	11
3.4. Procedimentos Restauradores.....	11
3.5. Procedimentos Cirúrgicos.....	19
3.6. Preparo das Amostras para Microscopia Eletrônica de Transmissão.....	20
4. RESULTADOS .....	26
5. DISCUSSÃO .....	34
6. CONCLUSÃO .....	40
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	41
ANEXOS.....	52

## 1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Dentre as opções restauradoras, materiais poliméricos como os sistemas adesivos e os compósitos resinosos têm sofrido constantes melhorias nas suas propriedades físicas, mecânicas, estéticas e de manipulação, atraindo o interesse de clínicos e pesquisadores. Um dos principais objetivos da Odontologia Restauradora adesiva é a promoção de um selamento marginal durável e efetivo dos tecidos dentais. Diversos estudos foram, e têm sido realizados com o intuito de se desvendar os mecanismos da união aos substratos dentais, e de desenvolver técnicas e biomateriais capazes de mimetizar e substituir adequadamente a estrutura dental perdida. Assim, o desenvolvimento de produtos e técnicas que procuram restabelecer e simular a naturalidade das estruturas debilitadas de forma duradoura é o grande desafio da Odontologia Adesiva.

As observações associadas de diversas pesquisas trouxeram a Odontologia para a era adesiva, e contribuíram para a prática de procedimentos mais conservadores que também buscam recuperar a aparência natural e a estética do sorriso (Buonocore, 1955; Buonocore *et al.*, 1956; Bowen, 1963; Fusayama *et al.*, 1979; Nakabayashi *et al.*, 1982). Dentre os materiais restauradores estéticos, as resinas compostas, desenvolvidas por Bowen (1963), aparecem como um material eletivo nos procedimentos conservadores que envolvam devolução da forma, cor e função tanto em dentes anteriores quanto em dentes posteriores.

O aumento do número de casos realizados com as resinas compostas se deve principalmente ao avanço nos estudos relacionados à adesão e suas propriedades. Esses estudos se iniciaram com os trabalhos de Buonocore (1955; Buonocore *et al.*, 1956) com o condicionamento ácido do esmalte. Dentre as pesquisas que se sucederam, importantes informações surgiram com os trabalhos de Fusayama *et al.* (1979), no qual foi preconizado o condicionamento ácido total do esmalte e dentina e Nakabayashi *et al.* (1982), que apresentaram à comunidade científica uma zona fundamental para o processo adesivo: a zona de interdifusão resina-dentina ou camada híbrida.

A camada híbrida está relacionada ao processo de selamento das restaurações (Walshaw & McComb, 1996; Ferrari *et al.*, 2000), à redução da sensibilidade pós-operatória (Walshaw & McComb, 1996) e ao aumento da resistência de união ao esmalte e à dentina (Prati *et al.*, 1991; Davidson *et al.*, 1993; Harada *et al.*, 1998). A união aos substratos dentais ocorre principalmente através da interação micromecânica do agente de união com o esmalte condicionado e com as fibrilas colágenas expostas na dentina. Para conseguir uma união ao substrato dentinário com resinas adesivas, é preciso aplicar um ácido para que a camada superficial da dentina tenha a fase mineral totalmente ou parcialmente removida. Em seguida, esta região que era antes ocupada por mineral é substituída pela resina adesiva. O agente de união precisa infiltrar nesta rede de fibrilas colágenas e polimerizar *in situ*, formando a camada híbrida (Nakabayashi *et al.*, 1982).

Embora a união ao esmalte tenha se mostrado, através de diversas pesquisas, um procedimento seguro e confiável (Nakabayashi & Pashley, 2000), a união à dentina ainda é um desafio, devido à complexidade do substrato dental (Marshall *et al.*, 1997). A capacidade de retenção do esmalte está relacionada com o aumento na área e energia de superfície do esmalte condicionado (Gwinnet, 1971; Retief, 1973; Miyasaki *et al.*, 2000). Por outro lado, ao ser condicionada, a dentina apresenta uma diminuição na sua energia de superfície. Apesar de todos os avanços na área dos sistemas adesivos, a busca por um agente de união capaz de promover um selamento eficaz e duradouro ao substrato dentinário tem sido uma tarefa árdua (Hashimoto *et al.*, 2000).

A microestrutura da dentina e suas propriedades são os principais determinantes de boa parte das operações em Odontologia Restauradora. Por ser um complexo biológico hidratado, a dentina sofre mudanças fisiológicas, pelo envelhecimento e devido à doença cárie, produzindo diferentes formas de substratos, devido a alterações nos componentes fundamentais da estrutura, determinadas por mudanças no seu arranjo, de inter-relações ou químicas. (Marshall *et al.*, 1997). Estas formas de dentina são importantes na relação com os procedimentos restauradores adesivos (Nakajima *et al.*, 1995; Nakajima *et al.*, 1999).

A maior parte do dente é composta pela dentina, um substrato formado por aproximadamente 50% de material inorgânico e 30% de matéria orgânica, que apresenta túbulos preenchidos por prolongamentos odontoblásticos e fluido dentinário, que respondem por 20% do volume dentinário, proporcionando-lhe uma característica úmida (Marshall *et al.*, 1997; Itthagarun & Tay, 2000). A parte orgânica é composta por colágeno, que responde por 95% do total, e os outros 5% são as proteínas não-colagenosas, que apesar de estarem presentes em pequenas quantidades, são de fundamental importância no processo de mineralização do tecido. As proteínas não-colagenosas são importantes também na manutenção da estrutura e reexpansão da rede de fibrilas de colágeno expostas pelo condicionamento ácido, e conseqüentemente, na adesão (Pereira *et al.*, 2006). A parte inorgânica consiste principalmente de cristais de hidroxiapatita com a fórmula  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ , embora traços de carbonato de cálcio, fluoreto, magnésio e zinco sejam também encontrados na dentina. Os cristais de hidroxiapatita estão na forma de placas achatadas com uma dimensão aproximada de 60 a 70 nm de comprimento, 20 a 30 nm de largura e 3 a 4nm de espessura (Avery, 2005).

Os túbulos dentinários são formados quando ocorre deposição e mineralização da matriz de pré-dentina ao redor dos processos odontoblásticos. Os túbulos são uma das características mais marcantes da dentina, e a permeabilidade deste tecido é uma conseqüência direta de sua presença (Gage *et al.*, 1989). Na parte interna, o túbulo se apresenta como uma área pobre em colágeno, com destaque para uma zona hipermineralizada ao redor, o qual é denominada de “dentina peritubular”, apesar do termo mais correto ser dentina intratubular, devido ao local onde há de fato a deposição de dentina (Linde & Goldberg, 1993). Os túbulos são separados pela dentina intertubular composta por uma matriz de colágeno reforçada por cristais de hidroxiapatita. Os túbulos dentinários representam o caminho percorrido pelos odontoblastos da câmara pulpar até a junção amelo-dentinária ou cemento. A extensão dos processos odontoblásticos dentro dos túbulos dentinários em um dente maduro é um tema polêmico. Isso ocorre porque alguns autores acreditam que essa extensão limite-se à metade da extensão do túbulo (Holland, 1976; Thomas, 1983); enquanto outros, em contraste, demonstram através de estudos com imunohistoquímica que os

prolongamentos se estendem até a junção amelo-dentinária (Sigal *et al.*, 1984), apesar de alguns desses estudos terem sido realizados em animais.

Os túbulos apresentam formato cônico e convergem para a polpa, desta forma sua distribuição e densidade variam dependendo da localização e de alterações no tecido dentinário (Phrukkanon *et al.*, 1999; Giannini *et al.*, 2001; Ogata *et al.*, 2001). Garberoglio & Brännström, em 1976, demonstraram que a densidade tubular na dentina profunda é de aproximadamente 45.000 túbulos/mm<sup>2</sup> enquanto na dentina superficial esta densidade diminui para aproximadamente 20.000 túbulos/mm<sup>2</sup>; o diâmetro dos túbulos varia de 2,5µm em dentina profunda a 0,9µm próximo à junção amelo-dentinária. Estes valores são inversamente proporcionais à resistência de união, já que o mecanismo de adesão depende, em sua maior parte, da retenção micromecânica produzida pela infiltração e polimerização dos monômeros resinosos na região de dentina desmineralizada (Suzuki & Finger, 1988; McCabe & Rusby, 1992; Giannini *et al.*, 2001).

A qualidade e durabilidade da adesão estão diretamente relacionadas à eficiência da penetração dos monômeros nos espaços interfibrilares, ao completo envolvimento das fibrilas colágenas pelo adesivo resinoso, e à taxa de polimerização desta resina (Pashley *et al.*, 2000; Giannini *et al.*, 2003). Os espaços interfibrilares, antes preenchidos por cristais de apatita, são da ordem de 20nm quando vistos em microscopia eletrônica de transmissão, e a profundidade desta zona de espaços interconectados varia de 4 a 9µm, dependendo da agressividade do ácido e do tempo de condicionamento. Apesar desta distância ser linear nas fotomicrografias, a distância de difusão é bem maior devido à tortuosidade dos canais. O movimento de monômeros resinosos nestes longos, contínuos e interconectados canais é um exemplo de permeabilidade intradentinária (Pashley *et al.*, 2000). A permeabilidade pode ser influenciada dependendo da composição e do modo de aplicação dos sistemas adesivos.

Os sistemas adesivos podem ser classificados em função da estratégia de ação (condicionamento ácido prévio com ácido fosfórico – *etch-and-rinse*, ou auto-condicionamento – *self-etch*) e do número de passos utilizados durante o procedimento adesivo. Dependendo de como os três passos fundamentais de condicionamento,

aplicação do primer e aplicação da resina adesiva são realizados ou combinados, os adesivos estão disponíveis em sistemas de três passos, dois passos, ou de passo único. O substrato pode ser tratado através da utilização do ácido fosfórico ou de monômeros ácidos, que condicionam e se infiltram simultaneamente. Em comum, as estratégias e o material utilizado visam estabelecer uma interface de união forte e duradoura com a estrutura dental.

A aplicação do ácido fosfórico remove a camada de esfregaço criada durante a realização do preparo cavitário (Prati *et al.*, 1995; Perdigão *et al.*, 1996), promove um aumento do diâmetro dos túbulos (Prati *et al.*, 1995, Carvalho *et al.*, 1996) e desmineraliza a dentina inter e intratubular (Eliades *et al.*, 1997), deixando uma rede úmida e microporosa de fibrilas de colágeno expostas (Van Meerbeek *et al.*, 1992; Pashley *et al.*, 1993). Após a desmineralização promovida pelo condicionamento ácido, a rede desmineralizada de fibrilas colágenas permanece suspensa na água. Cada fibrila é separada uma da outra por um espaço preenchido com água, a qual ocupa o espaço que era anteriormente ocupado por cristais de apatita. Removendo-se a água existente entre estas fibrilas promove-se um colapso desta rede, eliminando o espaço necessário para a infiltração de monômero (Carvalho *et al.*, 1996; Maciel *et al.*, 1996; Nakabayashi & Pashley, 2000). No entanto, é possível reexpandir esta rede, reumedecendo-a com água ou aplicando primers, que podem conter uma solução aquosa de HEMA.

Kanca (1992; 1992a) e Gwinnett (1992), demonstraram que a presença de umidade é necessária para se obter maiores valores de adesão à dentina após a aplicação do ácido fosfórico. Seus resultados se justificam pela presença de solventes orgânicos nas soluções adesivas. Os solventes, altamente hidrófilos, penetram na superfície úmida desmineralizada “em direção à água”, levando consigo os monômeros que estão diluídos juntos na solução. Em contato com a água, estes solventes elevam sua pressão de vapor, e a concentração de monômero aumenta à medida que a água evapora, ou seja, a função dos solventes é promover a substituição da água pelo monômero hidrófilo (Kanca, 1992; Kanca, 1992a; Reis *et al.*, 2003). O conceito da técnica de adesão úmida à dentina, acima mencionado, é indicado na maioria dos sistemas adesivos disponíveis, resultando em uma camada híbrida mais resistente,

devido a melhor penetração dos monômeros resinosos nos espaços entre as fibrilas colágenas (Nakajima *et al.*, 2000).

Com o objetivo de reduzir as dificuldades técnicas para permitir uma umidade ideal na dentina após a lavagem do ácido fosfórico e simplificar os procedimentos adesivos, foi desenvolvida uma técnica onde *primers* auto-condicionantes modificam a *smear layer* e posteriormente, uma camada de adesivo hidrófoba é aplicada. Com essa técnica, acredita-se que haja uma desmineralização e infiltração dos monômeros resinosos de forma simultânea, evitando o possível colapso das fibrilas colágenas pela secagem com ar ou a ocorrência de fibrilas expostas e não protegidas pela resina (Watanabe *et al.*, 1994; Tay & Pashley 2001; Carvalho *et al.*, 2005). Recentemente, uma técnica auto-condicionante de adesão que consiste em um passo único de aplicação foi introduzida. Os adesivos de passo único reúnem as etapas de condicionamento, infiltração e adesão em um único procedimento (Tay & Pashley, 2001). Apesar destes sistemas de união serem comercializados como simplificados, devido ao menor número de passos de aplicação, eles são na realidade misturas complexas de monômeros resinosos hidrófilos e hidrófobos, solventes, água e outros aditivos (Tay & Pashley, 2001).

Acredita-se que a absorção de água pelo polímero formado tanto na camada híbrida, quanto na camada de adesivo pode contribuir para a degradação da união à dentina ao longo do tempo (Tanaka *et al.*, 1999; Hashimoto *et al.*, 2000). Apesar dos avanços alcançados pelos adesivos dentinários, trabalhos apontam para uma possível degradação da união da resina composta aos tecidos dentais ao longo do tempo, tanto *in vitro* quanto *in vivo* (Sano *et al.*, 1999; Hashimoto *et al.*, 2000; De Munck *et al.*, 2003; Giannini *et al.*, 2003). A redução da resistência de união de sistemas adesivos à dentina é atribuída à degradação das fibrilas colágenas e/ou da resina adesiva (Tay *et al.*, 2003). Fatores como a viscosidade da solução do adesivo e o colapso da malha de fibrilas colágenas podem dificultar a infiltração do agente de união. As taxas de sorção de água e solubilidade apresentadas pelos sistemas adesivos após a sua polimerização são importantes na determinação da longevidade e qualidade marginal da restauração (Reis *et al.*, 2007). Sabe-se que a umidade presente no meio oral ou de armazenagem tem um papel importante no processo de degradação química dos polímeros,

apresentando um efeito deletério para a interface resina-dentina (Göpferich, 1996). Somando-se a este fato, a degradação hidrolítica dos polímeros sintéticos é um evento previsível, já que eles são naturalmente degradáveis. O fator que diferencia é o período de tempo que o processo de degradação leva para acontecer (Göpferich, 1996). A degradação de um polímero é definida como o processo de cisão da corrente polimérica, durante o qual esta é quebrada em segmentos menores (oligômeros), e em circunstâncias especiais, até em monômeros novamente (Örtengren, 2000). Essa degradação hidrolítica também acontece em diferentes severidades com os materiais poliméricos odontológicos como os sistemas adesivos e as resinas compostas.

As interfaces de união resina-dentina se degradam em três estágios. Primeiro, a água é absorvida pelo polímero, desencadeando a degradação química (Göpferich, 1996). Segundo, produtos de degradação, monômeros não reagidos e oligômeros são removidos da camada híbrida e da camada de adesivo. Terceiro, as fibrilas de colágeno expostas podem ser degradadas por metaloproteinases (MMPs) presentes na dentina ou saliva (Pashley *et al.*, 2004).

Existe na literatura um consenso com respeito à ocorrência de nanoinfiltração em praticamente todos os procedimentos adesivos (Li *et al.*, 2000; Pioch *et al.*, 2002; Tay *et al.*, 2003; Reis *et al.*, 2004; Reis *et al.*, 2006). O termo “nanoinfiltração” foi introduzido para se descrever a ocorrência de espaços nanométricos dentro da camada híbrida, mesmo na ausência de uma fenda na interface de união (Sano *et al.*, 1995). Esta técnica utiliza um traçador de baixo peso molecular como o nitrato de prata ( $\text{AgNO}_3$ ) para evidenciar tais porosidades na interface. Esta área de união é observada em microscopia eletrônica (Sano *et al.*, 1995; Reis *et al.*, 2004). A deposição de grãos de prata na camada híbrida dos sistemas que utilizam o condicionamento ácido prévio é atribuída à existência de regiões nas quais as fibrilas colágenas não foram totalmente envolvidas pela resina adesiva, ou onde a resina não foi adequadamente polimerizada. A degradação da união tem sido atribuída à penetração de fluidos nestas porosidades (Hashimoto *et al.*, 2000). Pouco se sabe a respeito da composição do fluido que circula nestas porosidades. Porém, acredita-se que contenha enzimas e outras proteínas provenientes do fluido dentinário, além de produtos de degradação e monômeros não reagidos.

A infiltração incompleta da rede de colágeno desmineralizada e microporosa com o adesivo resulta na presença de uma zona fragilizada dentro da camada híbrida e entre a camada híbrida e a dentina íntegra (Van Meerbeek *et al.*, 1992; Sano *et al.*, 1994; Sano *et al.*, 1995; Spencer & Swafford, 1999; Tay *et al.*, 2003; Tay *et al.*, 2003a). Esta zona é considerada uma área propícia à degradação e capaz de influenciar a resistência de união (Sano *et al.*, 1999; Hashimoto *et al.*, 2000; Hashimoto *et al.*, 2001). Partindo do princípio que há uma zona desmineralizada e não infiltrada pelo adesivo, principalmente nos sistemas em que se utiliza o condicionamento prévio, e que esta área pode propiciar uma degradação da interface adesiva e comprometer a eficiência da restauração, é necessário pesquisar quais os fatores que podem influenciar as características dessa zona e o que ocorre com esta estrutura ao longo do tempo, em nível ultramorfológico.

Existem evidências na literatura demonstrando que a dentina desmineralizada por soluções ácidas pode ser remineralizada *in vivo* (Kato & Fusayama, 1970; Miyauchi *et al.*, 1978). No entanto, a observação ultra-estrutural da possibilidade de remineralização da região dentinária desmineralizada e não infiltrada pelo adesivo apresenta poucos dados na literatura (Tatsumi *et al.*, 1992; Akimoto *et al.*, 2001). Muita informação tem sido gerada sobre o comportamento das interfaces resina-dentina ao longo do tempo *in vitro*, no entanto poucos dados estão disponíveis a respeito do comportamento desta interface *in vivo*, especialmente em seres humanos.

Partindo do pressuposto que haja uma remineralização da dentina desmineralizada em seres humanos, o mecanismo de deposição desse mineral, além de complexo, pela ocorrência de processos biológicos e físico-químicos que agem estimulando essa deposição de mineral, pode estar relacionado com a mineralização fisiológica que ocorre na formação da dentina, após a erupção do elemento dental, denominada dentina secundária. É interessante do ponto de vista ultra-morfológico novos estudos que comparem o processo de remineralização da zona desmineralizada e não infiltrada pelo sistema adesivo com a mineralização fisiológica dentinária.

## 2. PROPOSIÇÃO

Os objetivos deste estudo ultramorfológico foram: (1) observar o aspecto da mineralização fisiológica que ocorre na frente de mineralização na região circumpulpar e; (2) analisar o comportamento da interface adesiva resina-dentina após um período de 6 meses *in vivo*, quanto à possibilidade da ocorrência de um processo de remineralização na camada híbrida. A hipótese nula testada foi a de que não ocorre remineralização da região dentinária desmineralizada pelo condicionamento ácido após o período proposto.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. Aspectos Éticos

O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo 1), bem como o projeto de pesquisa foram avaliados e aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Guarulhos (Projeto nº SISNEP/96 – Anexo 2), devido ao fato da pesquisa ser realizada em seres humanos. Todos os pacientes foram devidamente informados dos propósitos do estudo e quais procedimentos restauradores seriam realizados clinicamente. Após a leitura e assinatura do termo de consentimento, as etapas clínicas eram iniciadas.

#### 3.2. Amostra

Foram selecionados 2 dentes pré-molares íntegros (n=2), com indicação para exodontia por motivos ortodônticos (Figura 3.1), de pacientes oriundos do curso de Especialização em Ortodontia da Universidade Guarulhos. Os fatores de inclusão foram: indivíduos do gênero masculino ou feminino, idade entre 12 e 20 anos, ausência de doença geral ou bucal pregressa, bem como a ausência de lesões de cárie.

Como critérios de exclusão foram considerados os pacientes impossibilitados de se realizar o isolamento absoluto do campo operatório ou pela presença de alguma variação anatômica das raízes que dificultasse a exodontia, visualizada através da radiografia periapical de diagnóstico.



**Figura 3.1.** Dente pré-molar íntegro indicado para exodontia por motivos ortodônticos.

### 3.3. Delineamento Experimental

Em cada dente foram realizados dois preparos do tipo Classe I e restaurados com resina composta, porém com um intervalo de 6 meses de diferença entre as restaurações. A restauração inicial foi denominada restauração tardia, pois permaneceu um período no meio bucal. A restauração realizada após 6 meses, de restauração imediata, devido ao fato do dente ser extraído no mesmo dia de sua realização. As restaurações foram executadas por um único operador, sendo uma na fóssula mesial e outra na fóssula distal da superfície oclusal. Com o objetivo de não viciar a amostra, a restauração tardia era iniciada ora pela fóssula mesial, ora pela fóssula distal (Tabela 1).

**Tabela 1.** Condições elaboradas para distribuição da restauração tardia em relação ao tipo de fóssula.

	<b>Fóssula Mesial</b>	<b>Fóssula Distal</b>
<b>Dente 1</b>	Restauração Tardia	Restauração Imediata
<b>Dente 2</b>	Restauração Imediata	Restauração Tardia

### 3.4. Procedimentos Restauradores

A anestesia do elemento dental foi efetuada mediante a aplicação de solução anestésica loco-regional (Cloridrato de lidocaína e fenilefrina – Novocol 100 – SSWhite, SP-Brasil, Lote 0010106), seguido pela colocação do isolamento absoluto do campo operatório (Figura 3.2).

A Tabela 2 apresenta os materiais restauradores utilizados neste experimento. Os procedimentos restauradores estão ilustrados nas Figuras 3.2 a 3.16. O preparo cavitário foi iniciado na região da fóssula, seguindo a Tabela 1, com uma ponta diamantada esférica (1014, KG Sorensen, Barueri-SP, Brasil) (Figura 3.3 a,b), em alta rotação (Kavo, SP-Brasil) e sob intensa refrigeração, com o objetivo de facilitar o trabalho seqüencial. Utilizou-se então uma segunda ponta diamantada tronco-cônica de extremidade arredondada (3131, KG Sorensen, Barueri-SP, Brasil) nas mesmas

condições (alta-rotação e com refrigeração) para dar o formato e a profundidade planejada (Figura 3.4a,b).

As dimensões cavitárias foram: 3mm de profundidade, tendo como referência a crista marginal (posição da parede pulpar), 3mm no sentido vestibulo-lingual e 2mm no sentido méso-distal sempre conferidos com uma sonda periodontal milimetrada (Goldman-Fox/Willian, Hu-Friedy, Rio de Janeiro-RJ, Brasil) que funcionava como um guia (Figura 3.5). Esta conduta teve o objetivo de padronizar a profundidade da parede pulpar em uma dentina média à profunda.

Após o término do preparo cavitário, realizou-se o condicionamento dental com a aplicação do ácido fosfórico a 37% (Figura 3.6a). Para se verificar a fluidez e a consistência do mesmo, inicialmente este era aplicado sobre uma gaze (Figura 3.6b), evitando assim que durante a sua aplicação no preparo, ocorresse o extravasamento sem o devido controle. Por meio de um rigoroso controle da aplicação, o gel foi cuidadosamente dispensado sobre esmalte cavosuperficial do preparo e lá permaneceu durante 15s (Figura 3.7a). A seguir, o gel foi aplicado sobre a dentina, iniciando-se a contagem de permanência de 20s. (Figura 3.7b,c). Na seqüência, a cavidade foi lavada durante 20s com jato de ar/água (Figura 3.8a). O excesso de água do campo operatório foi removido inicialmente com o auxílio de uma gaze seca e esterilizada. Uma cânula de endodontia serviu para aspirar a umidade ao redor da cavidade, apenas na região do esmalte, tomando-se o cuidado para manter a dentina úmida (Figura 3.8b). Excessos de água da superfície dentinária foram removidos com aplicadores do tipo *microbrush* (Figura 3.9a,b) de modo que o esmalte anteriormente à aplicação do sistema adesivo se apresentasse branco opaco e a dentina com aspecto brilhante, demonstrando uma característica de umidade dentinária (Figura 3.9c).

Duas camadas do sistema adesivo resinoso de dois passos Prime&Bond NT foram aplicadas até que visivelmente se observasse um aspecto brilhante de toda a cavidade, pois segundo o fabricante uma “generosa quantidade” deve ser aplicada (Figura 3.10a,b,c). A superfície da dentina permaneceu assim por 20s. O solvente presente no adesivo (acetona) foi removido com um leve jato de ar por 5s a aproximadamente 2cm de distância. Esta camada de adesivo foi então fotoativada durante 10s, com uma unidade emissora de luz visível (Optilight Plus, Gnatus, Ribeirão

Preto-SP, Brasil) (Figura 3.11) e intensidade de  $600\text{mW}/\text{cm}^2$ , aferida com um radiômetro (Gnatus, Ribeirão Preto-SP, Brasil), o qual também foi utilizado para fotopolimerizar as resinas utilizadas na seqüência. Uma camada de aproximadamente 2mm de uma resina composta de baixa viscosidade (Protect Liner F) foi aplicada na parede pulpar (Figura 3.12a,b) e fotopolimerizada por 40s. A resina composta de baixa viscosidade foi utilizada com o intuito de facilitar a ultramicrotomia (Perdigão *et al.*, 2000).

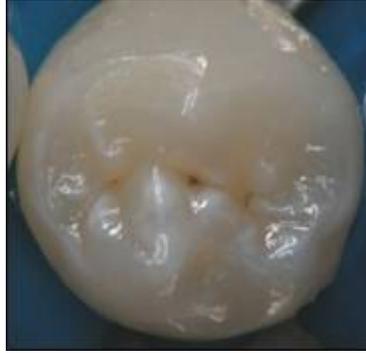
Na seqüência, a cavidade foi restaurada com uma resina composta microhíbrida pela técnica incremental (Figura 3.13a). Nas cavidades realizadas nas fóssulas distais optou-se pela colocação da resina na cor A2-O, enquanto nas cavidades das fóssulas mesiais, a resina escolhida foi a cor W-E, com o objetivo de facilitar a identificação no processamento das amostras (Figura 3.13b). Cada camada foi inserida pela técnica oblíqua de inserção (Pollack, 1987) (Figura 3.13c), com aproximadamente 1mm de espessura, e então polimerizada pela mesma unidade emissora de luz visível, durante 40s por incremento, segundo recomendação do fabricante, quando se utilizam cores mais opacas.

Ao término da restauração tardia (Figura 3.14), após os devidos ajustes oclusais, o paciente era dispensado e aguardava o intervalo de 6 meses para se realizar a outra restauração. Após o período proposto, a mesma seqüência operatória era então realizada na outra fóssula, com a preocupação de se utilizar a resina composta na cor adequada (Figura 3.15a,b). Ao final da realização da segunda restauração, o isolamento absoluto do campo operatório era cuidadosamente removido (Figura 3.16) e realizava-se a exodontia do elemento dental.

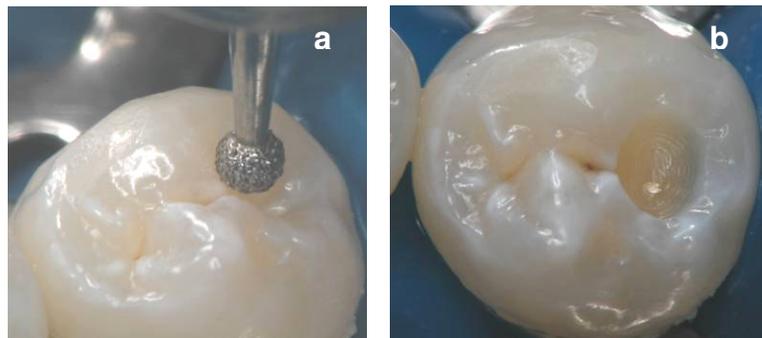
**Tabela 2.** Materiais, fabricantes, lote e composição dos produtos utilizados nos procedimentos restauradores.

Produto e Fabricante	Composição
<p><b>Condicionador ácido:</b> Condicionador dental gel a 37% (Dentsply, Petrópolis-RJ, Brasil) Lote 242437</p>	<p>Ácido fosfórico, sílica coloidal e corante</p>
<p><b>Sistema adesivo:</b> Prime&amp;Bond NT (Dentsply /Caulk, Milford-DE, EUA) Lote 168410</p>	<p>PENTA, UDMA, Resina R5-62-1, T-resina, D-resina nanométrica, hidrofluoreto de cetilamina, acetona, fotoiniciador</p>
<p><b>Resina de baixa viscosidade:</b> Protect Liner F (Kuraray Medical, Kurashiki, Japan) Lote 0062</p>	<p>Sílica coloidal silanizada em matriz pré-polimerizada (30%p), Bis-GMA, UDMA, TEGDMA, THFMA.</p>
<p><b>Resina composta:</b> Esthet-X A20, Esthet –X WE (Dentsply, De Trey-Konstanz, Alemanha) Lote 04062143</p>	<p>Bis-GMA Uretano modificado, BisEMA, TEGDMA, Vidro de Borossilicato de Flúor Alumínio e Bário Silanizados, Sílica Coloidal e Nanométrica</p>

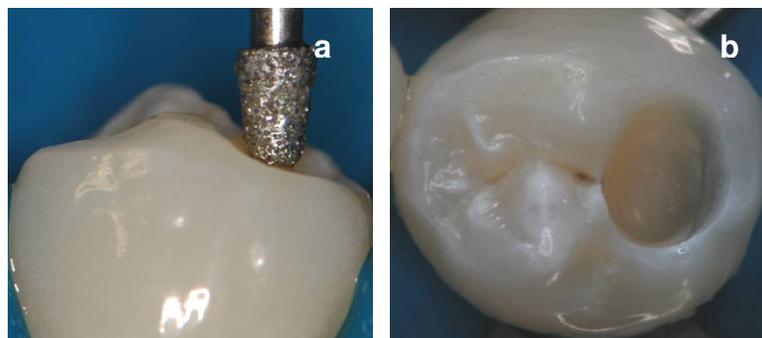
PENTA, Ácido fosfórico pentaacrilodipentaeritritol; TEGDMA, Trietileno glicol dimetacrilato; bis-GMA, Bisfenol-glicidil-dimetacrilato; UDMA, Uretano dimetacrilato; BisEMA, Bisfenol-A Dimetacrilato etoxilado



**Figura 3.2.** Isolamento absoluto do campo operatório previamente à realização dos procedimentos restauradores.



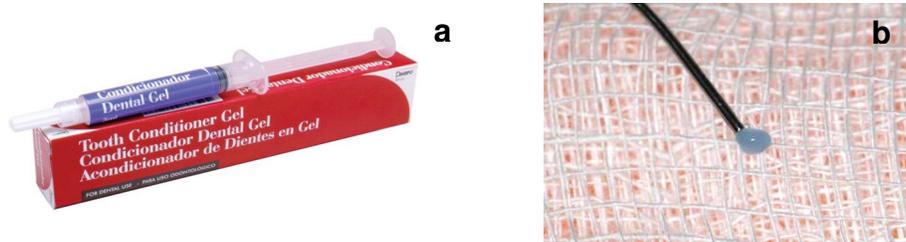
**Figura 3.3.** a) Ponta esférica diamantada em posição; b) Observação inicial do preparo após o acesso.



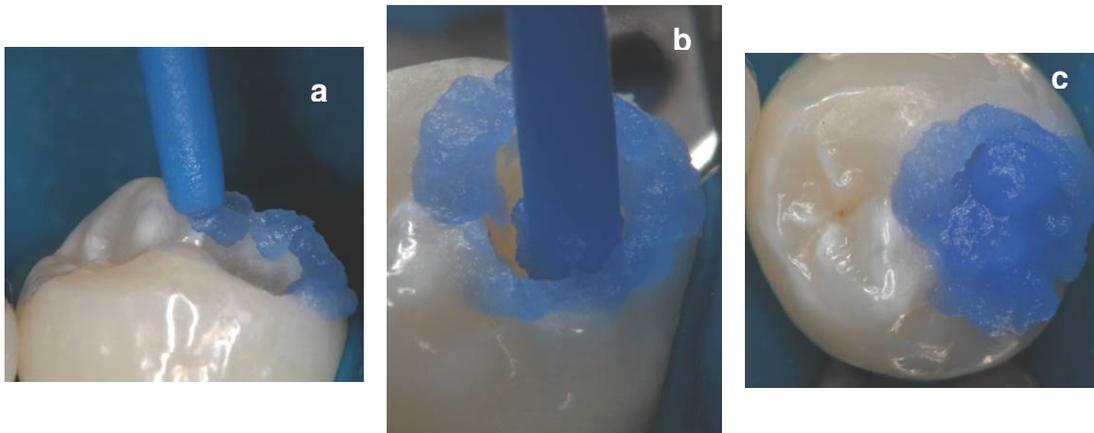
**Figura 3.4.** a) Ponta tronco-cônica diamantada em posição; b) Observação do preparo final.



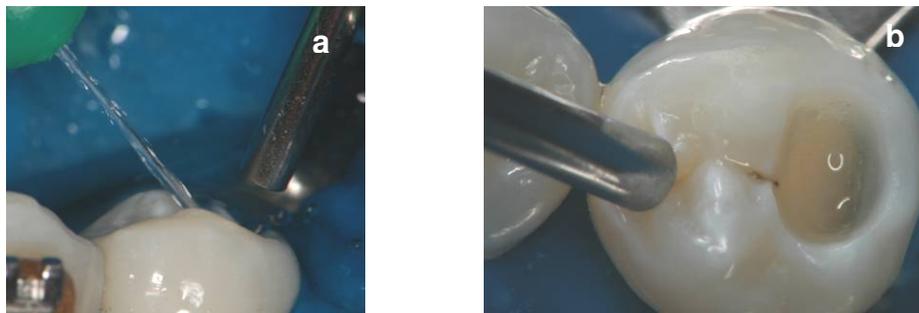
**Figura 3.5.** Sonda periodontal conferindo as dimensões do preparo em relação à profundidade.



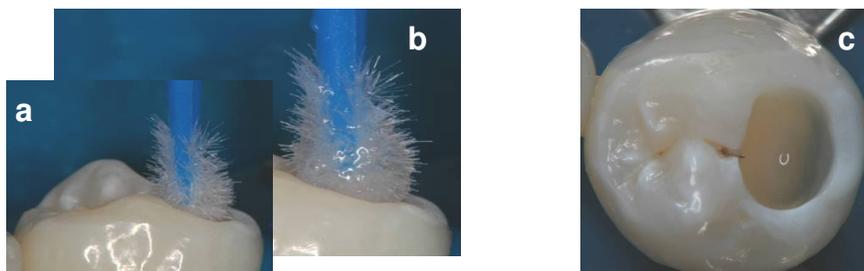
**Figura 3.6.** a) Gel de ácido fosfórico a 37% b) Verificação da fluidez sobre uma gaze.



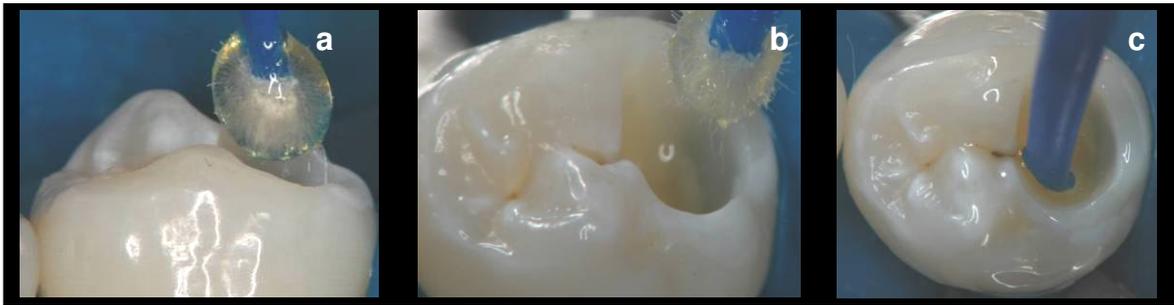
**Figura 3.7.** a) Ácido fosfórico sendo aplicado apenas no esmalte cavosuperficial; b) Início da aplicação do gel sobre a parede pulpar; c) Preenchimento de toda a cavidade preparada com o gel.



**Figura 3.8.** a) Lavagem do gel por 20s. b) Aspiração inicial do excesso da umidade com cânula de endodontia, com o cuidado de não desidratar demasiadamente a dentina.



**Figura 3.9.** Remoção do excesso de umidade dentinária: a) microbrush seco; b) microbrush úmido; c) Observação do aspecto esbranquiçado do esmalte cavosuperficial condicionado e o aspecto úmido da dentina localizada na parede pulpar do preparo.



**Figura 3.10.** a) Início da aplicação do sistema adesivo; b) Aplicação na superfície de esmalte cavo superficial; c) Aplicação em toda a dentina.



**Figura 3.11.** Fotopolimerização do Prime&Bond NT por 10s.



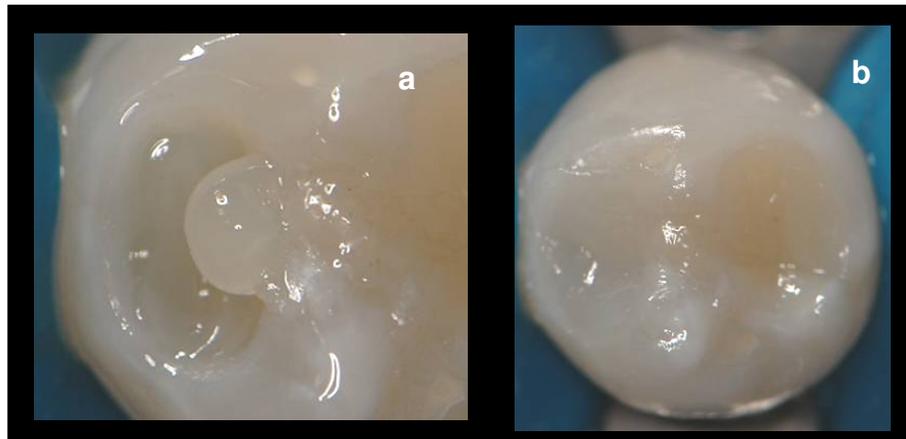
**Figura 3.12.** a) Detalhe da resina de baixa viscosidade; b) Aplicação em direção à parede pulpar.



**Figura 3.13.** a) Detalhe da resina utilizada; b) Identificação das resinas compostas de acordo com o posicionamento das cavidades; c) Inserção do incremento pela técnica oblíqua.



**Figura 3.14.** Restauração tardia finalizada.



**Figura 3.15.** Realização da restauração imediata: a) Destaque da cor WE (cavidade mesial); b) Restauração imediata finalizada.



**Figura 3.16.** Após a remoção do isolamento absoluto.

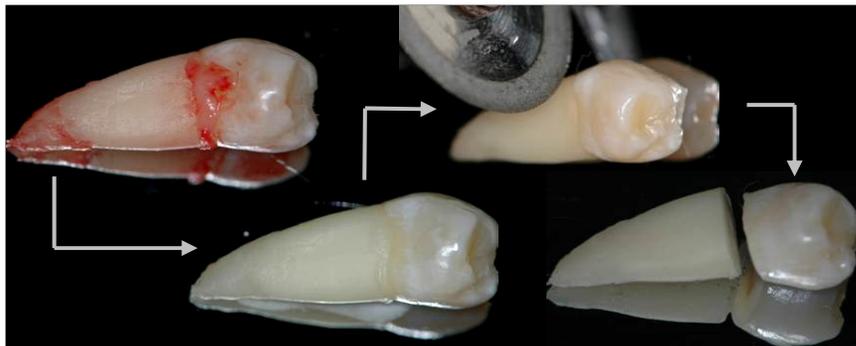
### 3.5. Procedimentos Cirúrgicos

Os movimentos de sindesmotomia (Freer duplo, Quinelato, SP-Brasil) e luxação, principalmente com alavancas do tipo Seldin reta (n.2, Quinelato, SP-Brasil), foram aplicados com a preocupação para que se realizasse uma avulsão menos traumática para o elemento dental. (Figura 3.17). Cuidados pós-operatórios eram transmitidos aos pacientes que retornavam em 1 semana para remoção da sutura e avaliação.



**Figura 3.17.** Procedimentos para a exodontia do elemento dental e sutura.

Após a remoção do elemento dental, os tecidos periodontais adjacentes a este eram removidos com curetas (McCall 17/18, Hu-Friedy, RJ-Brasil) e um corte com um disco diamantado dupla face para corte externo e interno (7020, KG Sorensen, Ind. Com. Ltda, SP-Brasil) em baixa rotação e com refrigeração, foi realizado 1mm abaixo da junção cimento/esmalte, separando a raiz da coroa dental (Figura 3.18), e deixado imerso inicialmente em solução fixadora de paraformaldeído (2,5%) com glutaraldeído (2,5%), conhecida como Solução de Karnovsky (Electron Microscopy Science, Hatfield, PA, EUA).



**Figura 3.18.** Limpeza dental e separação da coroa e raiz

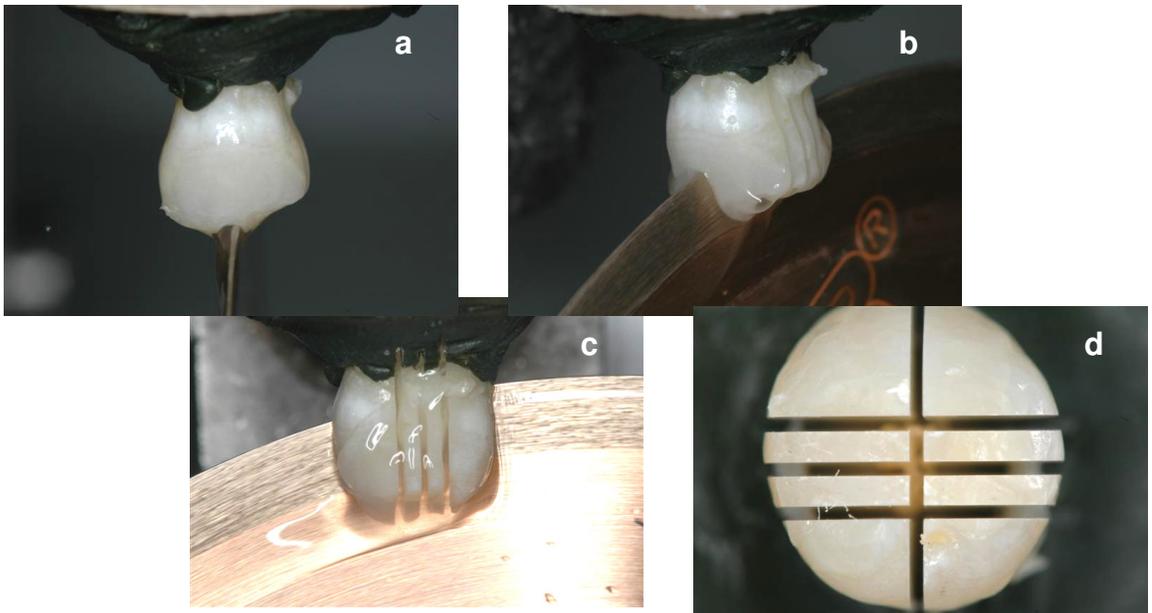
### 3.6. Preparo da Amostras para Microscopia Eletrônica de Transmissão

Para observação em Microscopia Eletrônica de Transmissão, as amostras foram inicialmente seccionadas em uma cortadeira metalográfica de precisão (IsoMet 1000, Buehler Ltd, Lake Bluff, IL, EUA) em fatias de aproximadamente 1mm de espessura no sentido mesio-distal do elemento dental sobre as restaurações confeccionadas (Figura 3.19).



**Figura 3.19.** a) Cortadeira metalográfica; b) Cortes mesio-distais; c) Cortes por uma vista oclusal.

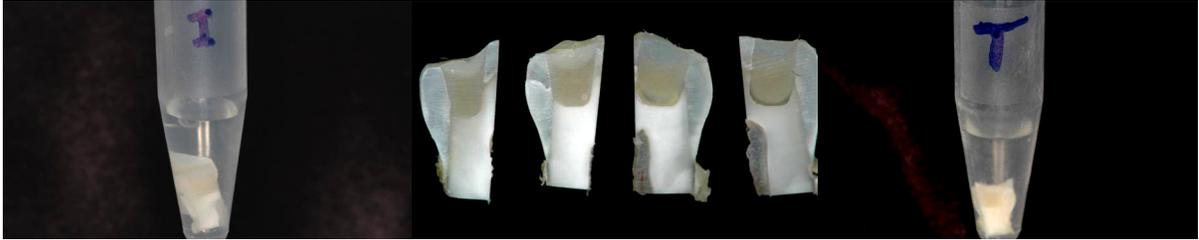
Em seguida, um corte paralelo ao sentido vestibulo-lingual foi realizado para que fosse separado a restauração da fossula mesial da restauração realizada na fossula distal (Figura 3.20).



**Figura 3.20.** a) Posicionamento para o corte vestibulo-lingual; b,c) Cortes sendo realizados; d) Cortes por uma vista oclusal.

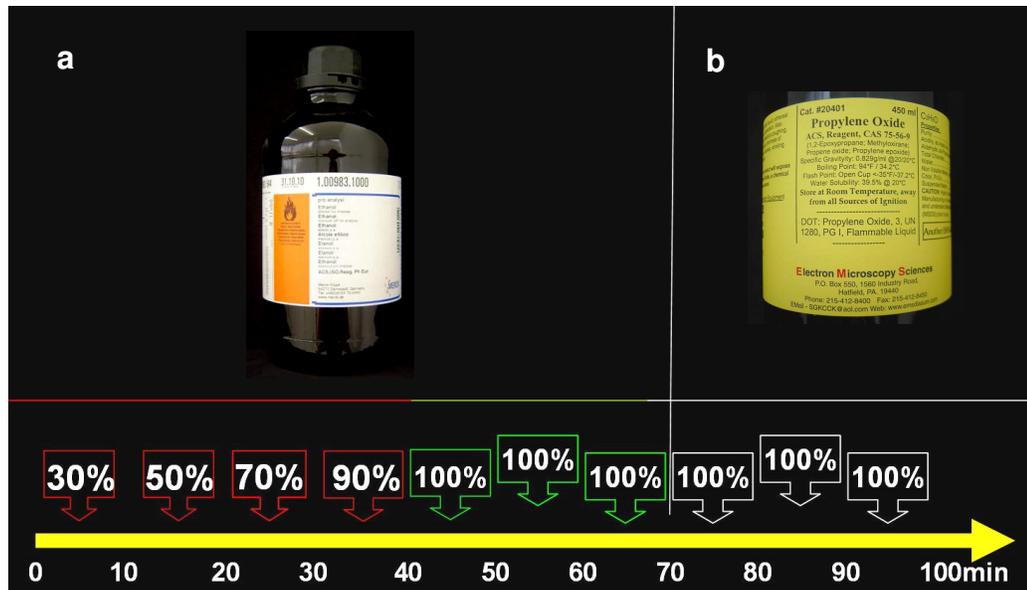
As amostras devidamente identificadas foram fixadas em nova Solução de Karnovsky por pelo menos 1h. Em seguida, receberam 3 trocas de 10min em tampão

Cacodilato de Sódio (0,05M). Após este passo, as amostras foram pós-fixadas em tetróxido de ósmio ( $\text{OsO}_4$ ) a 1% por 1h e lavadas com 3 trocas em água destilada de 10min (Figura 3.21). Os materiais utilizados para a fixação final foram manipulados (Electron Microscopy Science, Hatfield, PA, EUA).



**Figura 3.21.** Detalhe das amostras seccionadas ao centro e nas laterais com uma das soluções de fixação.

Após os procedimentos de fixação, os espécimes foram desidratados em concentrações crescentes (30, 50, 70, 90 e 100%) de etanol absoluto (Merck, Alemanha) (Figura 3.22a). Os espécimes ficaram imersos em cada concentração de álcool por um período de 10min, sendo que na concentração de 100% foram realizados 3 trocas. O óxido de propileno (Electron Microscopy Science, Hatfield, PA, EUA), (Figura 3.22b) foi utilizado como fluido de transição e com este produto foram realizados no final, 3 trocas de 10min.



**Figura 3.22.** a) Álcool etílico absoluto; b) Óxido de propileno

Após os procedimentos de desidratação, iniciaram-se os procedimentos de inclusão em resina epóxica. A resina utilizada neste experimento foi a resina Dr. Spurr (Electron Microscopy Science, Hatfield, PA, EUA) (Figura 3.23b), a qual após a mistura com proporções recomendadas pelo fabricante e verificadas por uma balança digital Digimed (KN 500, Knwaagen Balanças LTDA, SP-Brasil) (Figura 3.23a), foi colocada em um agitador magnético (752, Fisatom, SP-Brasil) (Figura 3.23c) por 15 min.



**Figura 3.23.** a) Balança digital; b) Constituintes da resina epóxica c) Agitador magnético

Com a resina Dr. Spurr manipulada, esta foi inicialmente diluída em óxido de propileno em uma concentração de 1:1 em volume. Os espécimes permaneceram nesta mistura de resina/óxido de propileno por um período de 12hs. Após este período foram imersas em resina a 100% por um período de 12hs (Figura 3.24a), em um dessecador sob vácuo (Figura 3.24b).



**Figura 3.24.** a) Amostras em resina epóxica 100%; b) Dessecador para a evaporação do óxido de propileno.

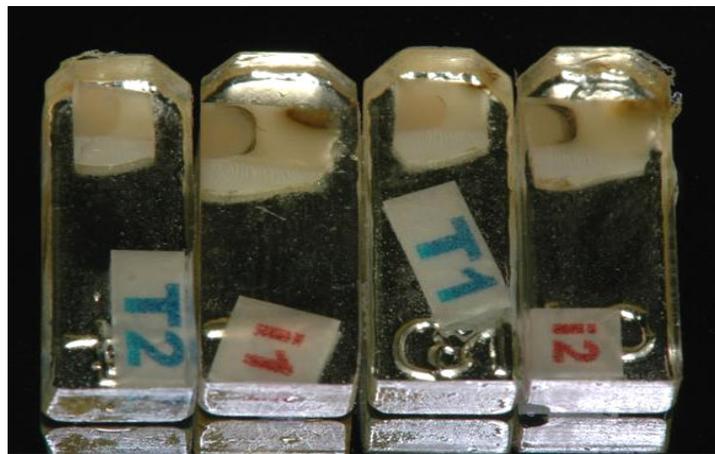
Decorrido este período, os espécimes foram então colocados em moldes de silicone (Electron Microscopy Science, Hatfield, PA, EUA) próprios para o

processamento para microscopia eletrônica de transmissão, já devidamente identificados (Figura 3.25a, b). A resina epóxica a 100% foi vertida sobre estes moldes em uma seqüência padronizada (Figura 3.25,c). Posteriormente, as amostras foram levadas a uma estufa (EI 1.6, Odontobrás, SP-Brasil) previamente aquecida a 80°C para polimerização da resina. Os espécimes permaneceram na estufa por um período de 48hs.

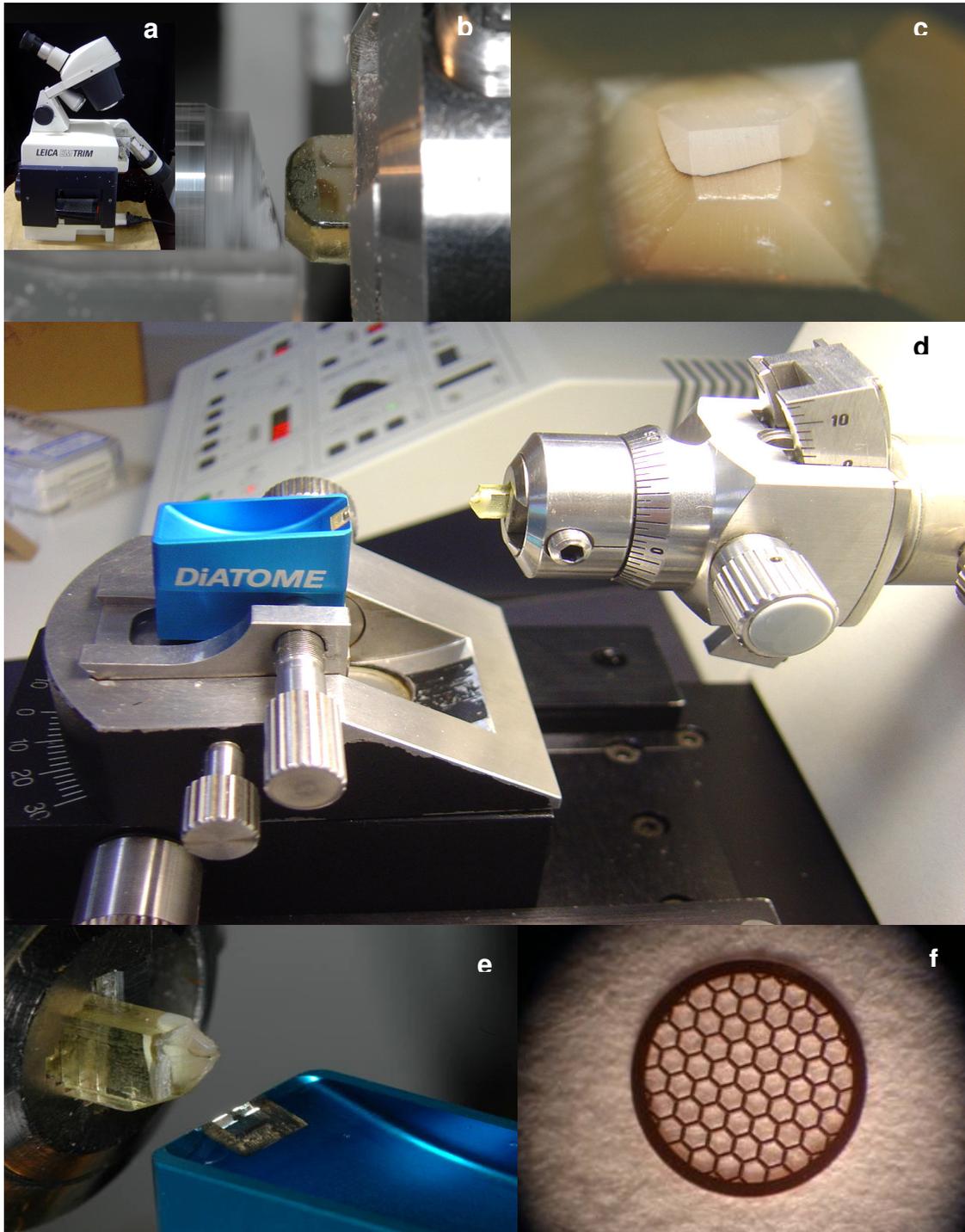


**Figura 3.25.** Seqüência para inserção no molde de silicone. a) Identificação; b) Inserção das amostras; c) Inserção da resina epóxica.

Após a polimerização dos blocos (Figura 3.26), os mesmos foram desbastados (Figura 3.27b) para redução da região que seria analisada a uma área de aproximadamente 0,5mm<sup>2</sup> (Figura 3.27c) com auxílio de um aparelho específico (Leica EM Trim, Wetzlar, Alemanha) (Figura 3.27a). Em seguida, os blocos foram levados a um ultramicrotomo (Figura 3.27d,e) para a obtenção de fatias ultrafinas de aproximadamente 90nm de espessura. A espessura da fatia é determinada pela coloração dourada da secção. As fatias ultrafinas foram coletadas e colocadas sobre grades de cobre (Figura 3.27f) cobertas com formvar e estabilizadas com carbono (Electron Microscopy Science, Hatfield, PA, EUA).

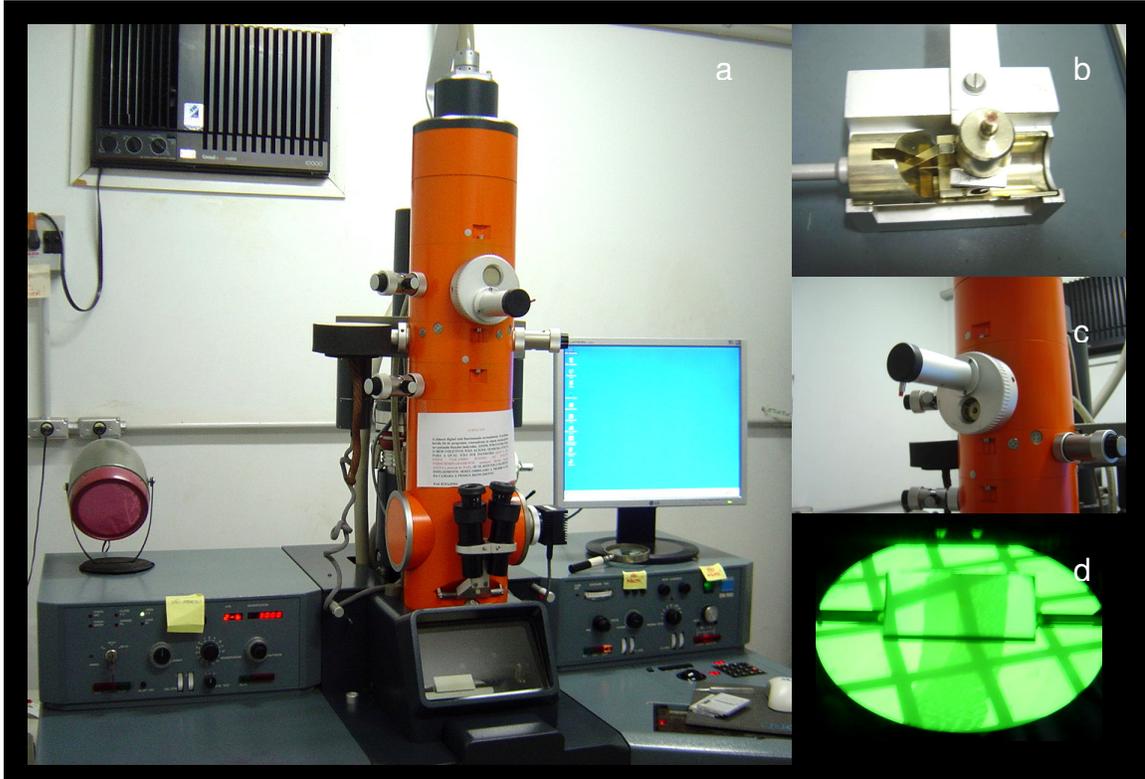


**Figura 3.26.** Blocos após a polimerização da resina epóxica.



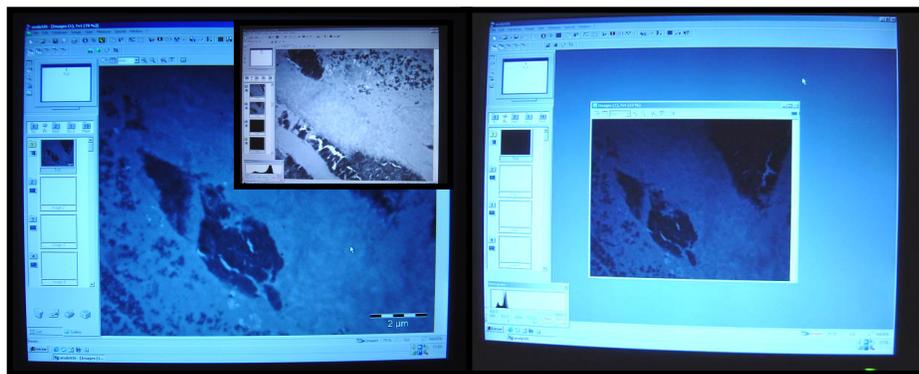
**Figura 3.27.** a) Aparelho Leica EM Trim; b) Realizando o desbastamento do bloco ; c) Bloco aparado; d) Ultramicrotomo com a amostra em posição; e) Detalhe da faca de diamante; f) Grades de cobre.

Fotomicrografias representativas foram realizadas em um microscópio eletrônico de transmissão (Zeiss EM 900, Zeiss, Munich, Alemanha) (Figura 3.28).



**Figura 3.28.** a) Microscópio Eletrônico de Transmissão; b) Aparato para a colocação do espécime; c) Eclusa para a colocação do aparato; d) Imagem vista pela janela de observação.

As imagens foram comparadas para se verificar as características ultramorfológicas das interfaces, principalmente em relação à possível remineralização do colágeno (Figura 3.29).

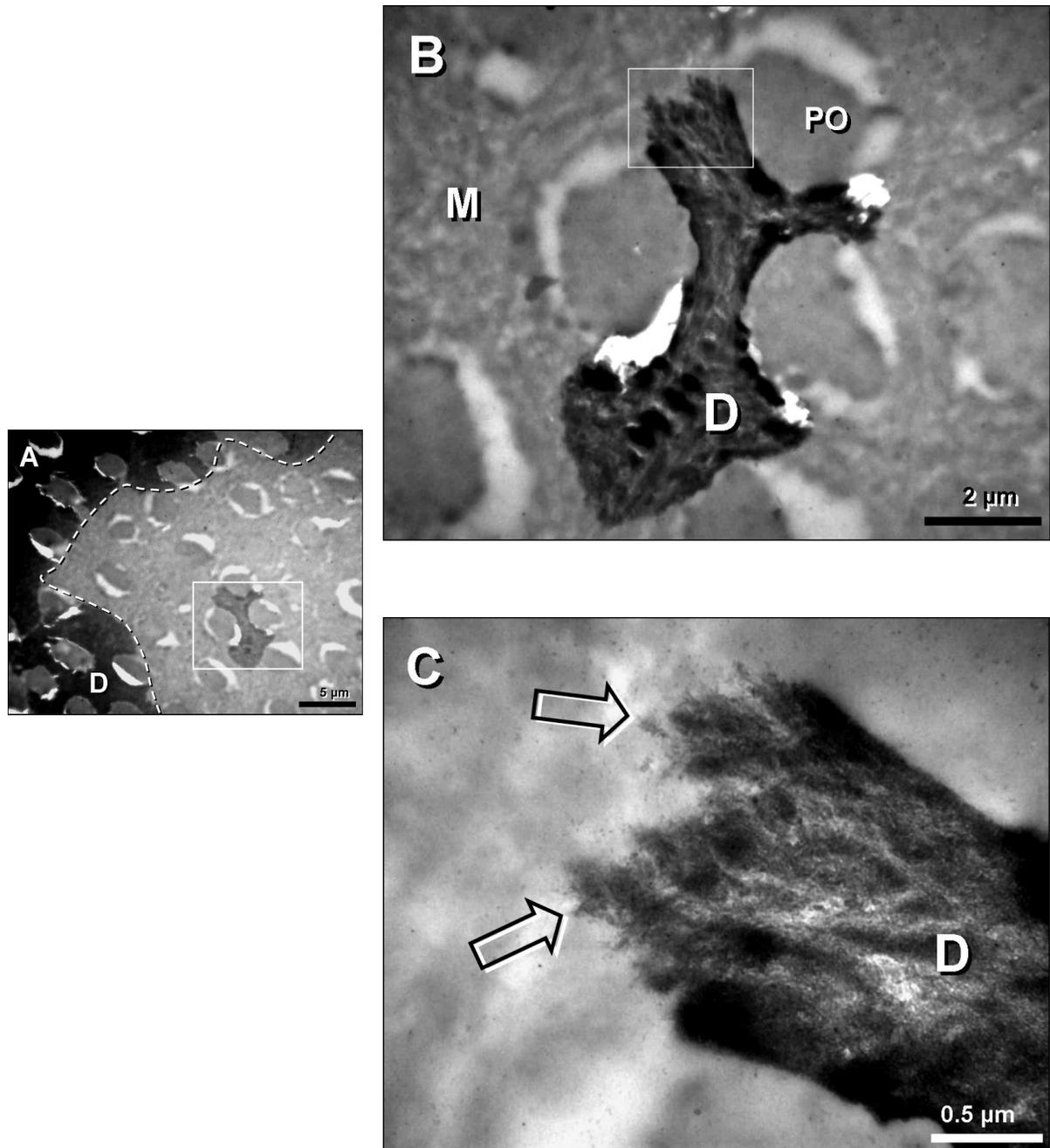


**Figura 3.29.** Visualização das imagens.

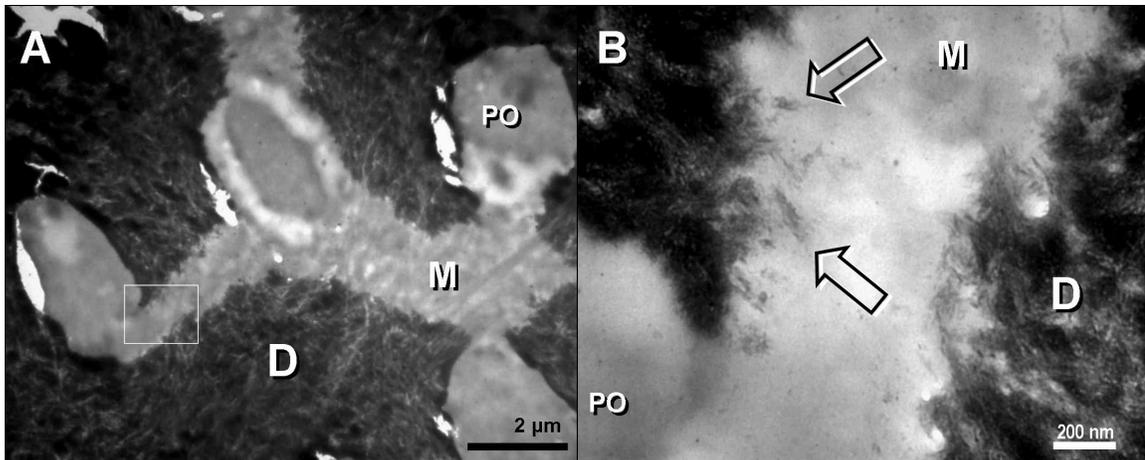
#### 4. RESULTADOS

Durante o preparo das amostras para microscopia eletrônica de transmissão, foram observadas dificuldades técnicas, que impediram a obtenção de secções ultrafinas para análise das interfaces resina-dentina nas duas restaurações imediatas e em uma restauração tardia, o que impediu que apresentássemos as imagens destes espécimes. As interfaces resina-dentina se separaram no momento do corte, o que não permitiu a sua observação. As imagens apresentadas ilustram aspectos representativos da região da frente de mineralização na região circumpulpar e também da região da interface resina-dentina após um período de 6 meses em função.

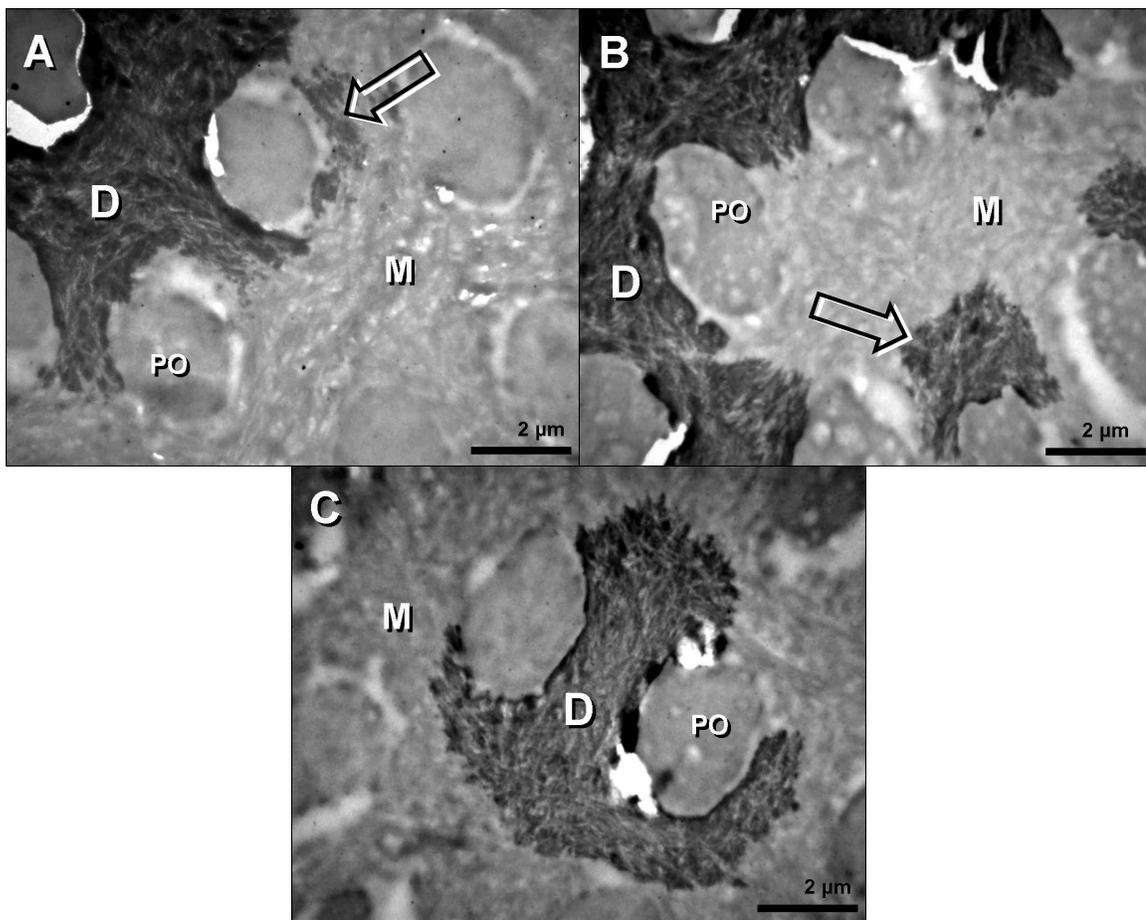
As Figuras 4.1 a 4.3 apresentam fotomicrografias eletrônicas de transmissão de secções não-desmineralizadas e não-coradas que ilustram o aspecto da frente de mineralização na região circumpulpar. Pode-se observar o processo de mineralização fisiológica que ocorre nesta região. As imagens demonstram a deposição de minerais na matriz orgânica não-mineralizada ao redor dos prolongamentos odontoblásticos na região da pré-dentina. As Figuras 4.2B e 4.3B apresentam em grande magnificação a deposição de cristais de hidroxiapatita nesta região. Na Figura 4.3, pode-se observar a íntima relação que os prolongamentos odontoblásticos têm com este processo de mineralização. A mineralização ocorre ao redor destes prolongamentos até formar uma matriz totalmente mineralizada.



**Figura 4.1.** Fotomicrografias eletrônicas de transmissão (METs) de secções não-desmineralizadas e não-coradas demonstrando a frente de mineralização que ocorre na região circumpulpar. A – a linha tracejada demonstra o limite da região de dentina mineralizada (D) e da região de pré-dentina que ainda está sofrendo o processo de mineralização. B – pode-se observar o processo de deposição mineral na frente de mineralização. A região com maior contraste representa a região mineralizada enquanto a região mais clara representa a matriz orgânica (M) composta principalmente por fibrilas colágenas e proteínas não-colagenosas. C – em maior magnificação observa-se com mais detalhe o processo de formação da dentina mineralizada (setas). (PO) prolongamentos odontoblásticos. Magnificação original: A-1.100X, B-3.000X, C-12.000X.



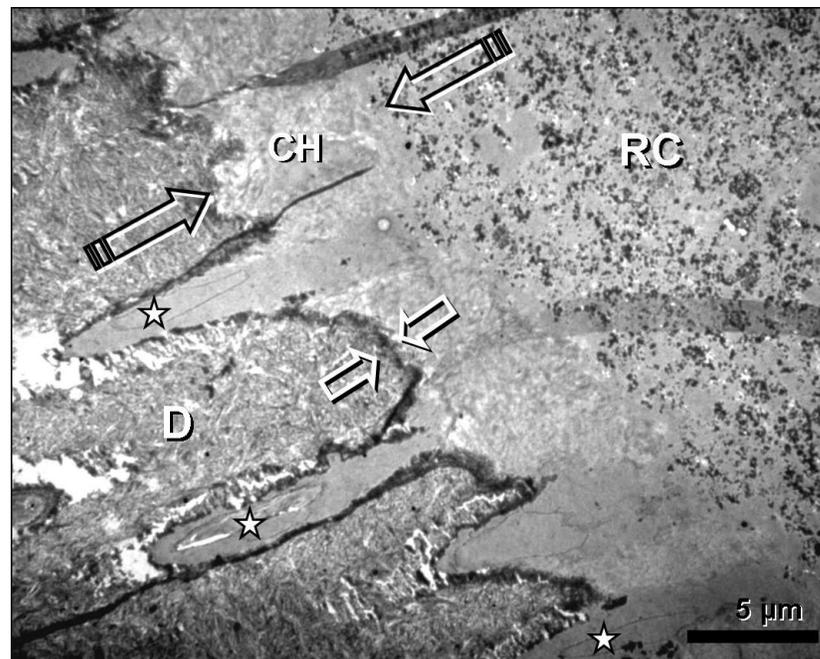
**Figura 4.2.** METs de secções não-desmineralizadas e não-coradas demonstrando o processo de formação da dentina secundária. A – a imagem demonstra o processo de deposição mineral na matriz orgânica (M) ao redor dos prolongamentos odontoblásticos (PO). B – com um maior aumento pode-se observar os cristais de hidroxiapatita (setas). Magnificação original: A – 3.000X, B – 20.000X.



**Figura 4.3.** As fotomicrografias demonstram que o processo de mineralização está intimamente relacionado com os odontoblastos, pois a mineralização ocorre ao redor dos seus prolongamentos (setas). (D) dentina mineralizada, (PO) prolongamento odontoblástico, (M) matriz orgânica não-mineralizada. Magnificação original: A-C – 3.000X.

Os resultados da observação das interfaces resina-dentina em microscopia eletrônica de transmissão estão apresentados nas Figuras 4.4 a 4.11. As imagens demonstram evidências da ocorrência de um processo de remineralização em algumas regiões da interface resina-dentina após um período de 6 meses em que as restaurações permaneceram em função *in vivo*.

A Figura 4.4 ilustra o aspecto da interface resina-dentina demonstrando uma camada híbrida de aproximadamente 5µm de espessura. Os prolongamentos de resina para dentro dos túbulos dentinários também podem ser observados. No interior dos túbulos dentinários foram observados os prolongamentos odontoblásticos envolvidos pela resina adesiva. Na base da camada híbrida, nota-se uma região de dentina com um aspecto mais elétron-denso, que representa possivelmente uma zona com uma concentração mineral maior que a dentina subjacente.

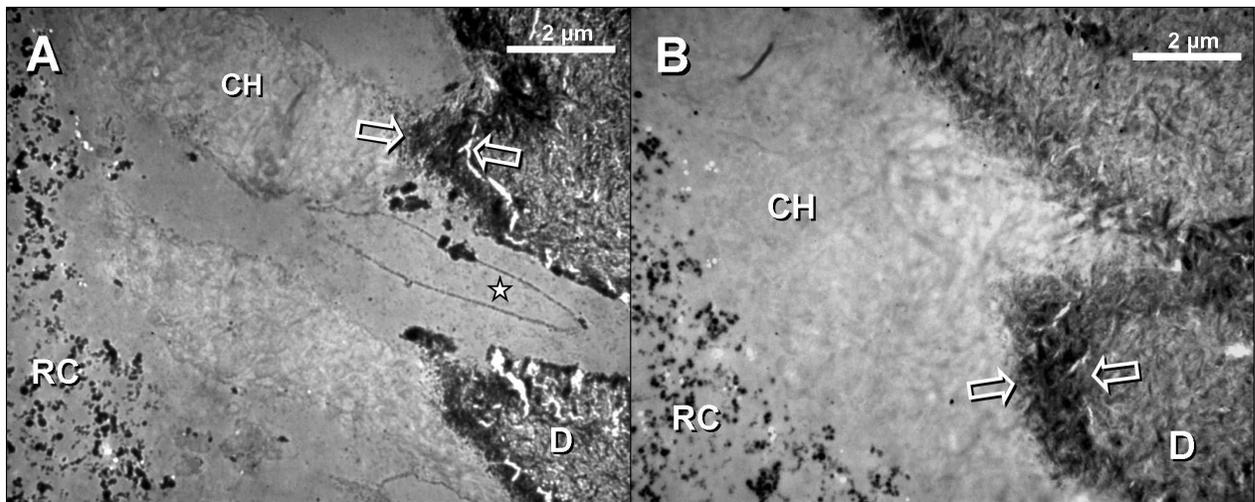


**Figura 4.4** MET de uma secção não-desmineralizada e não-corada da interface resina-dentina produzida pelo sistema adesivo Prime&Bond NT. As setas brancas apontam uma região mais elétron-densa na base da camada híbrida que aparenta apresentar maior conteúdo mineral que a dentina (D) subjacente. As estrelas brancas mostram a presença dos prolongamentos odontoblásticos envolvidos pela resina adesiva nos túbulos dentinários. (CH) camada híbrida, (RC) resina composta. Magnificação original: 1.100X.

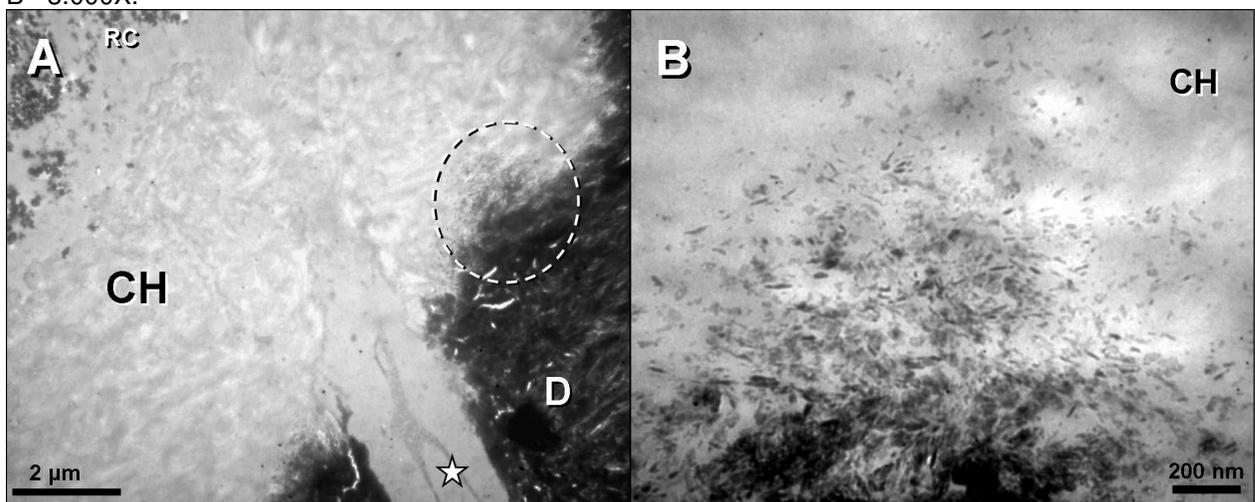
Pode-se observar com maior detalhe na Figura 4.5 esta zona mineralizada de aproximadamente 1µm de espessura com depósitos de cristais de hidroxiapatita na

base da camada híbrida. Na Figura 4.5A pode-se notar um prolongamento odontoblástico que se estende para o exterior da superfície dentinária na altura da camada híbrida e que se encontra envolvido pela resina adesiva. Ao redor deste prolongamento odontoblástico pode-se verificar alguns depósitos minerais na forma de vesículas.

A Figura 4.6B também ilustra em maior magnificação a deposição de cristais de hidroxiapatita na base da camada híbrida.

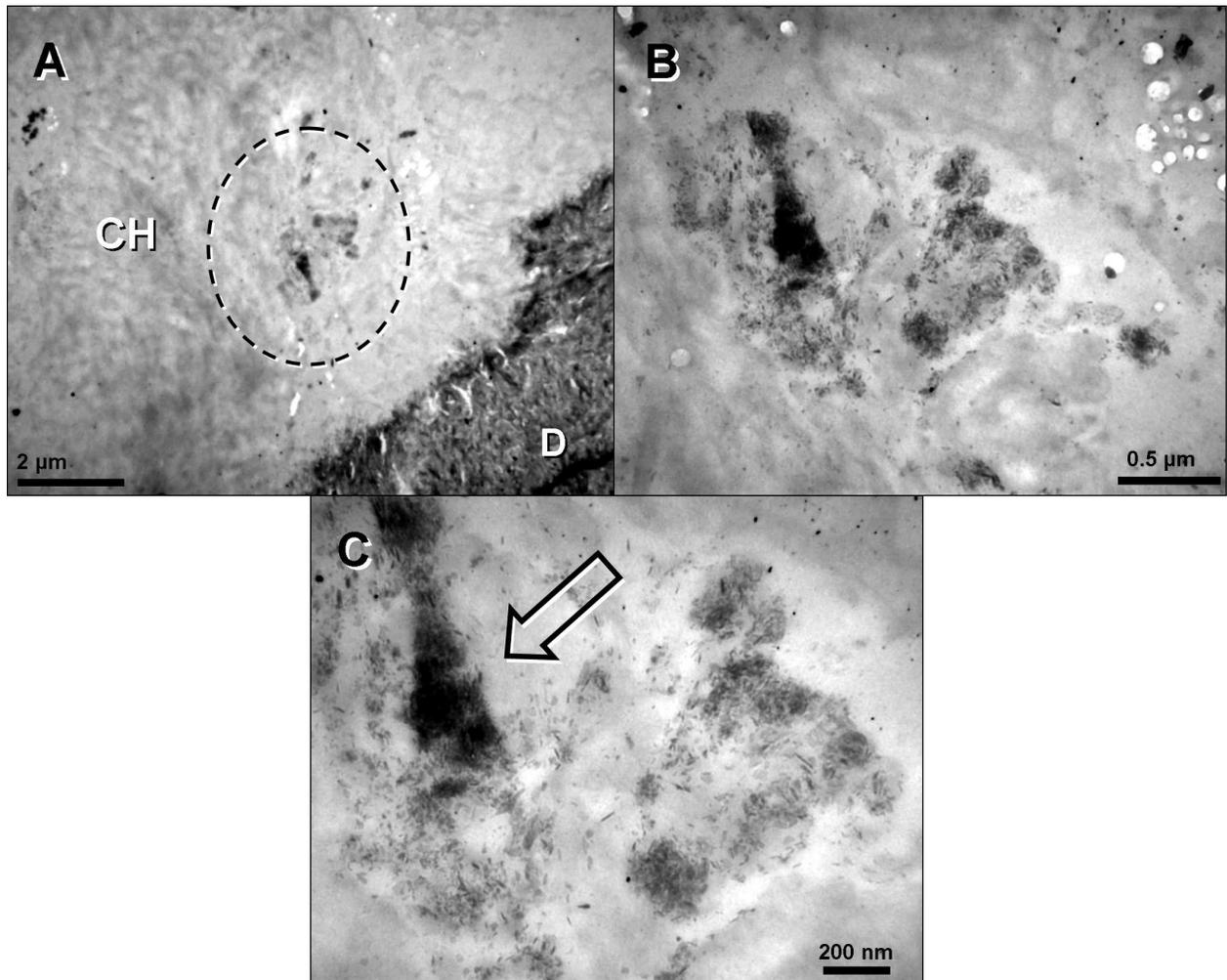


**Figura 4.5.** METs não-desmineralizadas e não-coradas representativas da interface resina-dentina. Observa-se uma zona hipermineralizada (entre as setas) na base da camada híbrida (CH). A estrela aponta a extensão de um prolongamento odontoblástico. (RC) resina composta. Magnificação original: A-B - 3.000X.



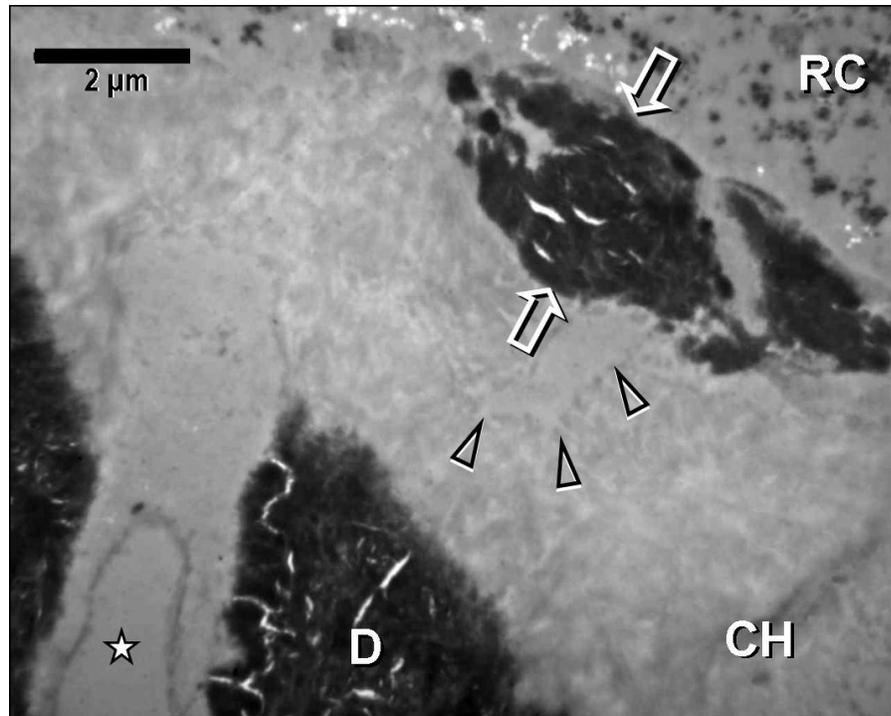
**Figura 4.6.** METs não-desmineralizadas e não-coradas representativas da interface resina-dentina. Pode-se observar o acúmulo de cristais de hidroxiapatita na base da camada híbrida (CH). A estrela mostra a extensão do prolongamento odontoblástico. (D) dentina, (RC) resina composta. Magnificação original: A - 3.000X, B - 20.000X.

Um aspecto interessante foi observado na Figura 4.7, na qual um processo de mineralização ocorreu no interior da camada híbrida. Aparentemente existe um núcleo de mineralização ao redor do qual o processo de deposição mineral acontece (Fig. 4.7C).

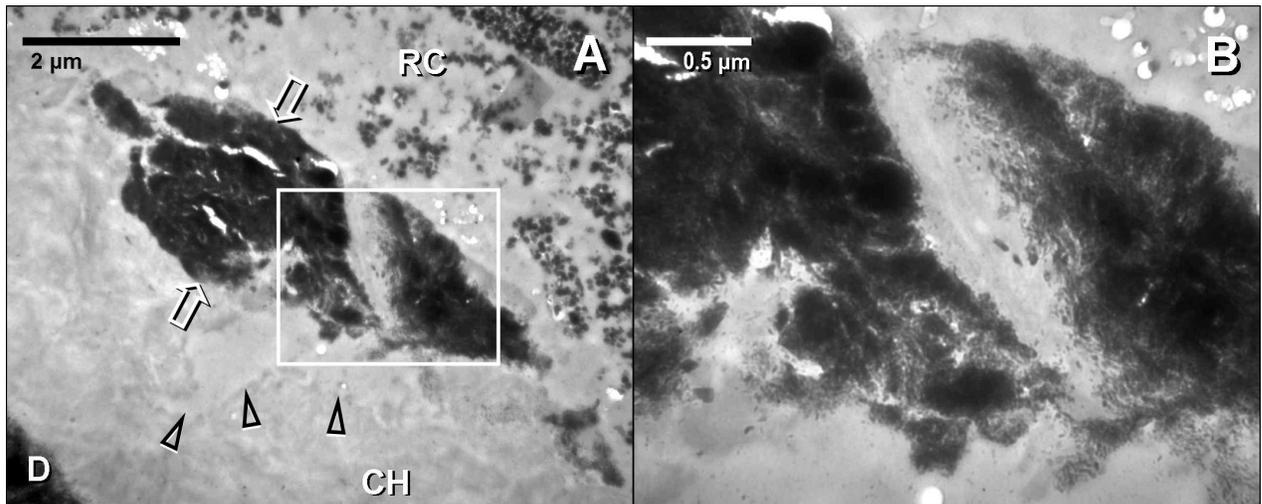


**Figura 4.7.** METs ilustrativas da interface resina-dentina demonstrando a ocorrência de um acúmulo de minerais no interior da camada híbrida (CH). (C) Em maior magnificação observa-se um núcleo de mineralização (seta) com maior concentração de cristais de hidroxiapatita, ao redor do qual ocorre a deposição de outros cristais. Magnificação original: A – 3.000X, B – 12.000X, C – 20.000X.

Em uma das regiões observou-se uma mineralização densa no topo da camada híbrida, como apresentado nas Figuras 4.8 e 4.9. Esta região apresentava aproximadamente 2 $\mu$ m de espessura. Na mesma imagem observou-se também logo abaixo a esta região mineralizada, uma região onde a rede de fibrilas colágenas que compõem a camada híbrida apresentavam um aspecto de desintegração.

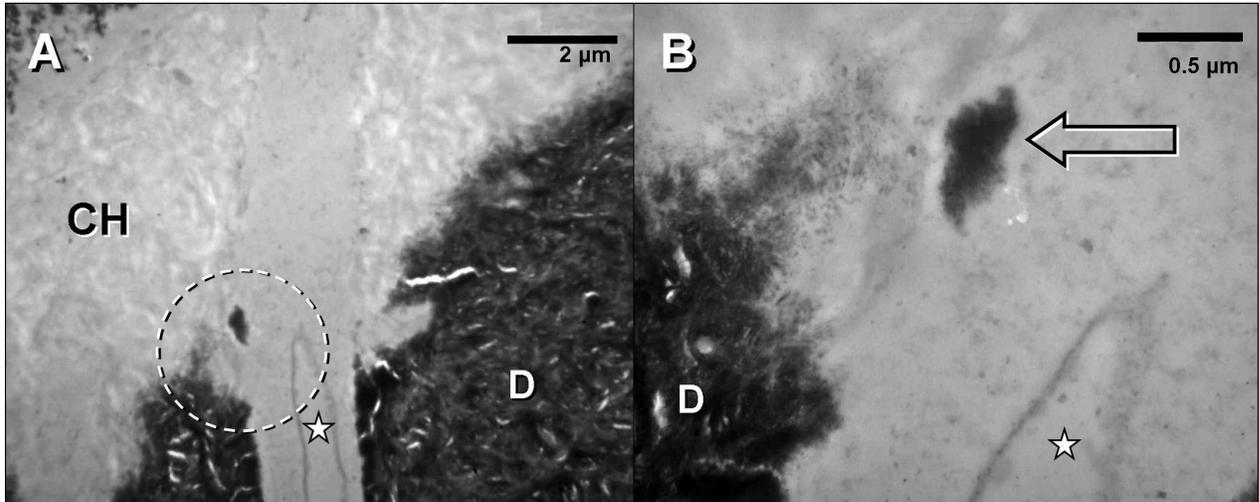


**Figura 4.8.** MET demonstra a interface resina-dentina, apresentando uma região densamente mineralizada (setas brancas) no topo da camada híbrida (CH), com aproximadamente 2 µm de espessura e 6 µm de extensão. Logo abaixo desta região observou-se uma zona que aparentemente ilustra a ocorrência de um processo de degradação das fibrilas colágenas na camada híbrida (pontas de setas). (D) dentina mineralizada, (RC) resina composta. Magnificação original: 3.000X.

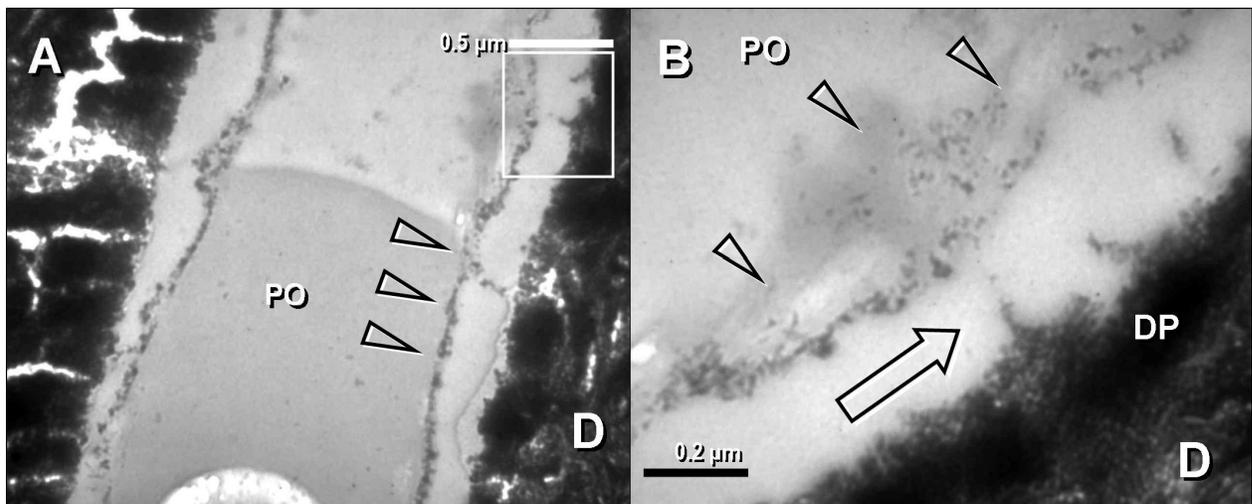


**Figura 4.9.** METs demonstram em maior magnificação um corte seriado da mesma região da interface resina-dentina apresentada na Figura 4.8. As setas brancas indicam uma região densamente mineralizada no topo da camada híbrida (CH). Logo abaixo desta região observou-se uma zona que aparentemente ilustra a ocorrência de um processo de degradação das fibrilas colágenas na camada híbrida (pontas de setas). (D) dentina mineralizada, (RC) resina composta. Magnificação original: A – 4.400X, B – 12.000X.

Em todas as regiões em que se observou o fenômeno de remineralização no interior da camada híbrida, pode ser notada a proximidade com os prolongamentos odontoblásticos, como pode ser visto na Figura 4.10a. Na Figura 4.10b, observa-se em grande aumento a relação do prolongamento odontoblástico com a dentina peritubular.



**Figura 4.10.** METs representativas da interface resina-dentina. Pode-se notar que o processo de mineralização (seta) na camada híbrida (CH) na maioria das vezes esteve associado à proximidade com os prolongamentos odontoblásticos (estrela). Magnificação original: A – 3.000X, B – 12.000X.



**Figura 4.11.** METs demonstrando o aspecto do prolongamento odontoblástico (PO) no interior do túbulo dentinário; dentina (D); dentina peritubular (DP). As pontas de setas apontam pequenas substâncias que aparentam estar sendo secretadas do prolongamento e provavelmente estão envolvidas na deposição de mineral e formação da dentina peritubular (seta). Magnificação original: A – 12.000X, B – 30.000X

## 5. DISCUSSÃO

O presente estudo demonstrou através das imagens obtidas com o microscópio eletrônico de transmissão (MET) algumas regiões que apresentam a ocorrência de uma mineralização fisiológica na frente de mineralização na pré-dentina, e também um processo de remineralização da estrutura dentinária desmineralizada após aplicação do ácido fosfórico para formação da camada híbrida. As imagens demonstram que a dentina, por ser um tecido vital e estar diretamente relacionada com a polpa, pode reagir de diferentes formas aos procedimentos restauradores. A utilização do MET mostrou detalhes jamais apontados na interface resina-dentina. A microscopia eletrônica de transmissão foi utilizada para a análise ultraestrutural das amostras no presente estudo, pois fornece mais detalhes da região estudada em relação à microscopia eletrônica de varredura, como demonstrou Van Meerbeek *et al.* (1993), em um estudo no qual foram comparadas as duas metodologias para análise da interface.

Os mecanismos envolvidos no processo de mineralização ou remineralização de um tecido vem sendo estudados ao longo de muitos anos. O processo não consiste apenas na combinação de íons cálcio e fosfato na matriz orgânica, gerando fosfato de cálcio, porém vários fatores biológicos e físico-químicos estão envolvidos estimulando ou inibindo a deposição de mineral (Katchburian & Arana, 1999). No presente estudo foi observada inicialmente a região da dentina circumpulpar, onde sabidamente ocorre um processo de mineralização, para que pudessem ser comparados os possíveis mecanismos de deposição mineral na frente de mineralização com o processo de mineralização que se esperava observar na interface resina-dentina. Este processo de mineralização na interface resina-dentina, observado no presente estudo corrobora com os relatos de Tatsumi *et al.* (1992) e Akimoto *et al.* (2001).

Através das imagens 4.1 a 4.3, o processo de mineralização ao redor dos prolongamentos dos odontoblastos, na região periférica ao tecido pulpar (pré-dentina), foi verificado nesse estudo. As regiões elétron-densas representam o acúmulo de mineral na matriz extracelular não-mineralizada, que é composta principalmente por fibrilas colágenas (regiões elétron-luscentes). A pré-dentina é uma camada não-

mineralizada presente durante a dentinogênese, mas que permanece durante toda a vida do elemento dental, separando os odontoblastos da dentina mineralizada (Linde & Goldberg, 1993). A partir do momento que se forma uma nova camada de dentina, permanece uma camada de pré-dentina de aproximadamente 30µm separando-a da camada dos odontoblastos (Katchburian & Arana, 1999). Na pré-dentina, a matriz extracelular é formada por fibrilas colágenas e contém uma maior quantidade de proteoglicanas e glicosaminoglicanas do que a dentina mineralizada. As proteínas não colagenosas estão relacionadas com o processo de mineralização (Linde, 1989; Lussi & Linde, 1993).

As imagens apresentadas demonstram que o processo de mineralização, tanto na região de pré-dentina, quanto na camada híbrida sempre esteve associado à presença dos odontoblastos ou dos seus prolongamentos. Os odontoblastos são típicas células secretoras de proteínas que constituem uma camada de células acoplada à pré-dentina, e são responsáveis pela sua formação. Os odontoblastos possuem duas partes nitidamente diferentes: o corpo celular e os prolongamentos odontoblásticos que estão presentes nos túbulos dentinários. A porção orgânica da dentina é produzida pelos odontoblastos. Essa porção, assim como ocorre em outros tecidos que sofrem mineralização, possui dois componentes: o componente fibrilar (fibrilas colágenas) e a substância fundamental interfibrilar. O processo de formação da dentina se inicia com a secreção das fibrilas colágenas, sendo a parte mais numerosa. Assim que há a formação de uma fina camada de matriz orgânica, inicia-se a deposição de mineral no seu interior (Katchburian & Arana, 1999). Os cristais de hidroxiapatita são visualizados como finas agulhas nas Figuras 4.6 e 4.7.

Na observação da interface resina-dentina foi verificada a presença dos prolongamentos odontoblásticos no interior dos túbulos e envolvidos pela resina adesiva (Figuras 4.4, 4.6, 4.8, 4.10 e 4.11). Estudos de imunohistoquímica evidenciam que a extensão do prolongamento odontoblástico vai até a junção dentina-esmalte (Sigal *et al.*, 1984). Os prolongamentos odontoblásticos possuem um desenvolvido sistema de microtúbulos e microfilamentos que se dispõem paralelamente ao seu longo eixo, apesar da carência de organelas (Linde & Goldberg, 1993). Os microtúbulos provavelmente participam no transporte de grânulos de secreção.

A dentinogênese ocorre primeiramente por uma formação de uma matriz colagenosa e posteriormente há uma deposição de cristais de fosfato de cálcio. Após a calcificação inicial, todos os cristais ficam associados dentro ou na superfície das fibras colágenas (Avery, 2005). A fase mineral que constitui a maior parte dos tecidos duros é um fosfato de cálcio, em geral sob a forma de hidroxiapatita. A hidroxiapatita é o tipo de apatita biológica que impregna os tecidos mineralizados formando cristais de tamanhos variados (Katchburian & Arana, 1999). Da mesma forma que existe uma matriz orgânica capaz de ser mineralizada na região da pré-dentina, acreditamos que ao desmineralizar a dentina com o ácido fosfórico para realizar os procedimentos adesivos, promove-se uma região com características estruturais bem próxima da matriz orgânica inicial. A matriz orgânica consiste em uma proteína fibrosa (colágeno tipo I) associada com quantidades e tipos variáveis de outras macromoléculas (proteoglicanos, fosfoproteínas e fosfolípidos). Essa matriz orgânica é capaz de receber mineral na forma de hidroxiapatita. As fibrilas de colágeno estão arranjadas com proteínas não colagenosas, tais como as proteoglicanas, que apresentam papel fundamental no processo de mineralização (Goldberg *et al.*, 2003; Wiesmann *et al.*, 2005).

Breschi *et al.* (2002), Breschi *et al.* (2003) e Pereira *et al.* (2006), demonstraram a presença de proteínas não colagenosas na região da camada híbrida. Estes trabalhos demonstram que mesmo após o condicionamento ácido, estas proteínas permanecem na região, e podem estar envolvidas no processo de remineralização observado. Apesar do fluido tecidual ser supersaturado em relação aos íons de cálcio e fosfato, a precipitação de fosfato de cálcio não ocorre de forma espontânea, pois o fluido contém também outras moléculas, as quais inibem a formação do cristal. Algumas proteínas não colagenosas, especialmente as fosforinas podem agir como nucleadoras e controlar o crescimento do cristal (Milan *et al.*, 2006; Dechichi *et al.*, 2006). Na Figura 4.7, observa-se a ocorrência de um núcleo de mineralização, ao redor do qual o processo de deposição mineral acontece.

O objetivo inicial do estudo, que seria comparar a restauração que permaneceu no meio oral por um período de 6 meses, com a restauração imediata não foi possível devido à perda dos espécimes deste grupo durante a realização da ultramicrotomia. O delineamento do presente estudo foi adaptado de um experimento

realizado por Miyauchi *et al.* (1978), que compararam os grupos em relação à recalcificação tecidual em dentes cariados. A formação dentinária tem sido estudada a vários anos tanto em modelos humanos como em animais (Cox *et al.*, 1992). Apesar de não terem sido apresentadas imagens obtidas no grupo controle, existe na literatura, um estudo que analisou *in vitro* a ultramorfologia da interface resina-dentina produzida pelo sistema adesivo Prime&Bond NT, o mesmo utilizado no presente experimento. No estudo realizado por Reis *et al.* (2006) não foi observada a presença de minerais na camada híbrida, tampouco a presença de processos odontoblásticos na interface. Após 6 meses de armazenagem em água, os autores observaram um aumento na nanoinfiltração, que foi atribuída à degradação da interface. Kato e Fusayama (1970) relataram a ocorrência de mineralização da dentina afetada por cárie em dentes polpados, o que não foi observado em dentes despolpados, demonstrando a importância da vitalidade dental neste processo. Estes resultados podem ser extrapolados para a comparação dos resultados obtidos *in vivo* e *in vitro*.

Apesar dos avanços alcançados pelos adesivos dentinários, trabalhos apontam para uma possível degradação da união da resina composta aos tecidos dentais ao longo do tempo na presença de água. A redução da resistência de união de sistemas adesivos à dentina é atribuída à degradação das fibrilas colágenas e/ou da resina adesiva (Sano *et al.*, 1999; Hashimoto *et al.*, 2000; De Munck *et al.*, 2003; Giannini *et al.*, 2003; Tay *et al.*, 2003). Fatores como a viscosidade da solução do adesivo e o colapso da malha de fibrilas colágenas podem dificultar a infiltração do agente de união. Embora o processo de degradação das interfaces resina-dentina seja um fenômeno previsível, pode-se esperar que ocorram outros fenômenos simultaneamente quando as interfaces são produzidas em dentes vitais, como realizado no presente estudo. As Figuras 4.8 e 4.9 ilustram regiões que demonstram um grande acúmulo de mineral. Nas mesmas fotomicrografias, pode-se observar também a presença de uma região que sugere a degradação das fibrilas colágenas.

Tanto o processo de degradação, quanto o processo de remineralização, só podem acontecer porque as interfaces não estão completamente seladas. A ocorrência da nanoinfiltração nas interfaces resina/dentina produzidas pelos sistemas adesivos é difícil de ser evitada. (Sano *et al.*, 1994, 1995; Hashimoto *et al.*, 2000; Reis *et al.*, 2004).

As cavidades restauradas no presente estudo apresentavam margem em esmalte, o que diminui a chance de penetração de produtos provenientes da cavidade oral (Lopes *et al.*, 2002; De Munck *et al.*, 2003). Desta forma, acredita-se que o fluido que circula nos espaços provenientes da nanoinfiltração era exclusivamente fluido dentinário. Neste fluido estão presentes metaloproteinases (MMPs) (Pashley *et al.*, 2004), que podem exercer um papel na degradação das fibrilas colágenas (Hebling *et al.*, 2005). MMPs são consideradas uma família de enzimas proteolíticas zinco dependentes que são capazes de degradar a matriz orgânica dentinária após a desmineralização (Tjäderhane *et al.*, 1998). No entanto, podem haver outras substâncias provenientes dos prolongamentos dos odontoblastos que podem circular por essas porosidades, revertendo o processo e auxiliando na remineralização dessas áreas. Além disso, sabe-se atualmente que no mesmo tecido que existem proteínas que degradam o colágeno, estão presentes também inibidores teciduais das metaloproteinases, que são denominadas de TIMPs, principalmente a TIMP 1 (Ishiguro *et al.*, 1994). Tatsumi *et al.* (1992), afirmaram que os prolongamentos dos odontoblastos podem fornecer fosfato de cálcio da polpa vital para a remineralização fisiológica. Isso ocorre porque o plasma e os fluidos extracelulares contêm uma quantidade de cálcio e fosfato iônico em sua composição, os quais são necessários para a formação de fosfato de cálcio (Katchburian & Arana, 1999).

Em trabalhos publicados recentemente, Koshiro *et al.* (2004; 2005) demonstraram a degradação da interface de união resina-dentina produzida em macacos após o período de um ano. Através da análise em microscopia eletrônica de transmissão (Koshiro *et al.*, 2005), os autores demonstraram sinais de degradação mais pronunciados nas interfaces produzidas pelo sistema adesivo Single Bond, que utiliza o condicionamento ácido prévio, quando comparado com o sistema adesivo auto-condicionante de dois passos Unifil Bond. Um fato interessante que foi relatado, mas não foi explorado pelos autores foi a presença de cristais de hidroxiapatita na interface dos espécimes que permaneceram em função na cavidade oral por um ano, o que não ocorreu com os espécimes restaurados e extraídos após 24hs.

Outro aspecto que poderia ter contribuído para a remineralização da interface seria a presença de íons flúor (hidrofluoreto de cetilamina) presente no

adesivo utilizado nesse estudo. Em um trabalho *in vitro* sobre remineralização dentinária, Itota *et al.* (2006), observaram diferenças nos resultados quanto a produtos que possuíam ou não flúor em sua composição. Em cavidades com ionômero de vidro ou resinas fluoretadas, o grau de radiopacidade da região da dentina desmineralizada aumentou significativamente quando comparada com a radiopacidade das amostras sem o flúor. O mesmo ocorreu em um estudo anterior (Itota *et al.*, 2003), quando se compararam adesivos que continham flúor na composição (grupo experimental) com adesivos que não continham flúor (grupo controle), e observaram também uma diferença favorável no grupo experimental. Em um estudo recente, Hayakawa *et al.* (2004) demonstraram que o fosfato de cálcio presente em uma solução supersaturada pode se depositar na presença de adesivos contendo um monômero fosforilado (10-MDP). No entanto, a presença de flúor, não é fundamental para que ocorra esse processo, pois Akimoto *et al.* (2001) mesmo sem a aplicação do adesivo em um dos grupos, após o período analisado verificaram também uma remineralização da área analisada. Além disso, Koshiro *et al.* (2005) utilizaram um adesivo que não apresenta flúor em sua composição, e mesmo assim foi observada a presença de hidroxiapatita na interface.

Poucos estudos têm avaliado *in vivo* os fenômenos que ocorrem na interface resina-dentina ao longo do tempo (Sano *et al.*, 1999; Hashimoto *et al.*, 2000; Donmez *et al.*, 2005; Hebling *et al.*, 2005; Koshiro *et al.*, 2005). Estudos a respeito do comportamento da interface resina-dentina em humanos são escassos. Até o presente momento, não se tem relato na literatura da ocorrência da remineralização da interface resina-dentina em humanos. Pode-se perceber que a mineralização biológica é um processo altamente complexo e que inúmeros mecanismos estão envolvidos, para iniciar e controlar esse processo. No presente estudo, o fenômeno da formação de mineral foi observado em duas regiões distintas, tanto na região da dentina circumpulpar como na região da camada híbrida. Mais estudos são necessários para se desvendar os mecanismos, e possíveis implicações que esta remineralização da interface possa ter nos procedimentos restauradores adesivos.

## 6. CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos e dentro dos limites do presente experimento devemos rejeitar a hipótese nula. Pôde-se visualizar a mineralização da dentina circumpulpar e também observar um processo de remineralização na interface resina-dentina *in vivo* após um período de 6 meses. Ao comparar os dois processos de mineralização e remineralização dentinária, uma íntima relação da formação de mineral com os prolongamentos odontoblásticos foi observada.

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS \***

Akimoto N, Yokoyama G, Ohmori K, Suzuki S, Kohno A, Cox CF. Remineralization across the resin-dentin interface: *In vivo* evaluation with nanoindentation measurements, EDS, and SEM. *Quintessence Int* 2001; 32(7): 561-70.

Avery, J. Desenvolvimento e histologia bucal. 3 ed. Porto Alegre/São Paulo: Artmed/Santos 2005.

Bowen RL. Properties of a silica reinforced polymer for dental restorations. *J Am Dent Ass* 1963; 66: 57-64.

Breschi L, Lopes M, Gobbi P, Mazzotti G, Falconi M, Perdigão J. Dentin proteoglycans: an immunocytochemical FEISEM study. *J Biomed Mater Res* 2002; 61(1): 40-6.

Breschi L, Perdigão J, Gobbi P, Mazzotti G, Falconi M, Lopes M. Immunocytochemical identification of type I collagen in acid-etched dentin. *J Biomed Mater Res A* 2003; 66(4): 764-9.

Buonocore MG. A simple method of increasing the adhesion of acrylic filling materials to enamel surfaces. *J Dent Res* 1955; 34(6): 849-53.

Buonocore MG, Wileman W, Brudevold F. A report on a resin composition capable of bonding to human dentin surfaces. *J Dent Res* 1956; 35(6): 846-51.

Carvalho RM, Yoshiama M, Pashley EL, Pashley DH. *In vitro* study on the dimensional changes of human dentine after demineralization. *Arch Oral Biol* 1996; 41(4): 369-77.

---

\*Baseado no modelo Vancouver. Abreviaturas dos periódicos em conformidade com o Medline.

Carvalho RM, Chersoni S, Frankenberger R, Pashley DH, Prati C, Tay FR. A challenge to the conventional wisdom that simultaneous etching and resin infiltration always occurs in self-etch adhesives. *Biomaterials* 2005; 26 (9): 1035-42.

Cox CF, White KC, Ramus DL, Farmer JB, Snuggs HM. Reparative dentin: factors affecting its deposition. *Quintessence Int* 1992; 23(4): 257-70.

Davidson CL, Abdalla AL, De Gee AJ. An investigation into the quality of dentine bonding systems for accomplishing a durable bond. *J Oral Rehabil* 1993; 20(3): 291-300.

Dechichi P, Biffi JC, Moura CC, Almeida AW. A model of the early mineralization process of mantle dentin. *Micron* 2006, doi: 10.1016/j.micron.2006.08.001.

De Munck J, Van Meerbeek B, Yoshida Y, Inoue S, Vargas M, Suzuki K, Lambrechts P, Vanherle G. Four-year water degradation of total-etch adhesives bonded to dentin. *J Dent Res* 2003; 82(2): 136-40.

Donmez N, Belli S, Pashley DH, Tay FR. Ultrastructural correlates of *in vivo/in vitro* bond degradation in self-etch adhesives. *J Dent Res* 2005; 84(4): 355-9.

Eliades G, Palaghias G, Vougiouklakis G. Effect of acidic conditioners on dentin morphology, molecular composition and collagen conformation *in situ*. *Dent Mater* 1997; 13(1): 24-33.

Ferrari M, Mason PN, Vichi A, Davidson CL. Role of hybridization on marginal leakage and bond strength. *Am J Dent* 2000; 13(6): 329-36.

Fusayama T, Nakamura M, Kurosaki N, Iwaku M. Non-pressure adhesion of a new adhesive restorative resin. *J Dent Res* 1979; 58(4): 1364-70.

Gage JP, Francis MJO, Triffitt JT. Collagen and Dental Matrices. 1 Ed. Londres: Butterworth & Co. Ltd, 1989.

Garberoglio R, Brännström M. Scanning electron microscopic investigation of human dentinal tubules. Arch Oral Biol 1976; 21(6): 355-62.

Giannini M, Carvalho RM, Martins LRM, Dias CTS, Pashley DH. The influence of tubule density and area of solid dentin on bond strength of two adhesive systems to dentin. J Adhes Dent 2001; 3(4): 315-24.

Giannini M, Seixas CAM, Reis AF, Pimenta LAF. Six-month storage-time evaluation of one-bottle adhesive systems to dentin. J Esthet Rest Dent 2003; 15(1): 43-9.

Goldberg M, Rapoport O, Septier K, Palmer K, Hall R, Embery G. Proteoglycans in predentin: the last 15 micrometers before mineralization. Connect Tissue Res 2003; 44(Suppl. 1): 184–8.

Göpferich A. Mechanisms of polymer degradation and erosion. Biomaterials 1996; 17(2): 103-14.

Gwinnett AJ. Histologic changes in human enamel following treatment with acidic adhesive conditioning agents. Arch Oral Biol 1971; 16(7): 731-8.

Gwinnett AJ. Moist versus dry dentin: its effect on shear bond strength. Am J Dent 1992; 5(3):127-9.

Harada N, Yamada T, Inokoshi S, Tagami J. Tensile bond strengths and interfaces of ten dentin bonding systems. J Med Dent Sci 1998; 45(2): 85-96.

Hashimoto M, Ohno H, Endo K, Kaga M, Sano H, Oguchi H. The effect of hybrid layer thickness on bond strength: demineralized dentin zone of the hybrid layer. *Dent Mater* 2000; 16(6): 406-11.

Hashimoto M, Ohno H, Kaga M, Endo K, Sano H, Oguchi H. Resin-tooth adhesive interfaces after long-term function. *Am J Dent*. 2001; 14 (4): 211-5.

Hawakawa T, Yoshinari M, Sakae T, Nemoto K. Calcium phosphate formation on the phosphorylated dental bonding agent in electrolyte solution. *J Oral Rehabil* 2004; 31(1): 67-73.

Hebling J, Pashley DH, Tjaderhane L, Tay FR. Chlorhexidine arrests subclinical degradation of dentin hybrid layers *in vivo*. *J Dent Res* 2005; 84(8): 741-6.

Holland GR. The Extent of the Odontoblast Process in the Cat. *J Anat* 1976; 121: 133-149.

Ishiguro K, Yamashita K, Nakagaki H, Iwata K, Hagakawa T. Identification of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) in human teeth and its distribution in cementum and dentine. *Arch Oral Biol* 1994; 39(4): 345-9

Itota T, Torii Y, Nakabo S, Tashiro Y, Konishi N, Nagamine M *et al*. Effect of fluoride-releasing adhesive system on decalcified dentin. *J Oral Rehabil* 2003; 30(2): 178-83.

Itota T, Nakabo S, Torii Y, Narukami T, Doi J, Yoshiyama M. Effect of fluoride-releasing liner on demineralized dentin. *Quintessence Int* 2006, 37 (4): 297-303.

Itthagarun A, Tay FR. Self-contamination of deep dentin by dentin fluid. *Am J Dent* 2000; 13(4): 195-200.

Kanca J. Effect of resin primer solvents and surface wetness on resin composite bond strength to dentin. *Am J Dent* 1992a; 5(4): 213-5.

Kanca J. Resin bonding to wet substrate. 1. Bonding to dentin. *Quintessence Int* 1992; 23: 39-41.

Katchburian E, Arana V. *Histologia e Embriologia oral*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1999.

Kato S, Fusayama T. Recalcification of artificially decalcified dentin *in vivo*. *J Dent Res* 1970; 49(5): 1060-7.

Koshiro K, Inoue S, Tanaka T, Koase K, Fujita M, Hashimoto M, Sano H. *In vivo* degradation of resin-dentin bonds produced by a self-etch vs. a total-etch adhesive system. *Eur J Oral Sci* 2004; 112(4): 368-75.

Koshiro K, Inoue S, Sano H, De Munck J, Van Meerbeek B. *In vivo* degradation of resin-dentin bonds produced by a self-etch and an etch-and-rinse adhesive. *Eur J Oral Sci* 2005; 113(4): 341-8.

Li H, Burrow MF, Tyas MJ. Nanoleakage patterns of four dentin bonding systems. *Dent Mater* 2000; 16(1): 48-56.

Linde A. Dentin matrix proteins: composition and possible functions in calcification. *Anat Rec* 1989 ; 224(2) : 154-66.

Linde A, Goldberg M. Dentinogenesis. *Crit Rev Oral Biol Med* 1993; 4(5): 679-728.

Lopes GC, Baratieri LN, Andrada MAC, Vieira LCC. Dental adhesion: Present state of the art and future perspectives. *Quintessence Int* 2002; 33(3): 213-24.

Lussi A, Linde A. Mineral induction *in vivo* by dentine proteins. *Caries Res* 1993; 27(4): 241-8.

Maciel KT, Carvalho RM, Ringle RD, Preston CD, Russell CM, Pashley DH. The effects of acetone, ethanol, HEMA, and air on the stiffness of human decalcified dentin matrix. *J Dent Res* 1996; 75(11): 1851-8.

Marshall GW Jr, Inai N, Wu-Magidi IC, Balooch M, Kinney JH, Tagami J *et al.* Dentine demineralization: effects of dentin depth, pH and different acids. *Dent Mater* 1997; 13(6): 338-43.

McCabe JF, Rusby S. Dentine bonding agents – characteristic bond strength as a function of dentine depth. *J Dent* 1992; 20(4): 225-30.

Milan AM, Sugars RV, Embery G, Waddington RJ. Adsorption and interactions of dentine phosphoprotein with hidroxyapatite and collagen. *Eur J Oral Sci* 2006; 114 (3): 223-31.

Miyauchi H, Iwaku M, Fusayama T. Physiological recalcification of carious dentin. *Bull Tokyo Med Dent* 1978; 25(3): 169-79.

Miyazaki M, Sato M, Onose H. Durability of Enamel Bond Strength of Simplified Bonding Systems. *Oper Dent* 2000; 25(2): 75-80.

Nakabayashi N, Kojima K, Masuhara E. The promotion of adhesion by infiltration of monomers into tooth substrates. *J Biomed Mater Res* 1982; 16(3): 265 -73.

Nakabayashi N, Pashley DH. *Hibridização dos tecidos dentais duros*. São Paulo: Quintessence Ed Ltd; 2000.

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

Nakajima M, Sano H, Zheng L, Tagami J, Pashley DH. Effect of moist vs. dry bonding to normal vs. caries-affected dentin with scotchbond multi-purpose plus. *J Dent Res* 1999; 78(7): 1298-303.

Nakajima M, Kanemura N, Pereira PNR, Tagami J, Pashley DH. Comparative microtensile bond strength and SEM analysis of bonding to wet and dry dentin. *Am J Dent* 2000; 13(6): 324-8.

Ogata M, Okuda M, Nakajima M, Pereira PN, Sano H, Tagami J. Influence of the direction of tubules on bond strength to dentin. *Oper Dent* 2001; 26(1): 27-35.

Örtengren U. On composite resin materials: Degradation, erosion and possible adverse effects in dentists. *Swed Dent J Suppl* 2000; (141): 1-61.

Pashley DH, Ciucchi B, Sano H, Horner JA. Permeability of dentin to adhesive agents. *Quintessence Int* 1993; 24(9): 618-31.

Pashley DH, Zhang Y, Agee KA, Rouse CJ, Carvalho RM, Russell CM. Permeability of demineralized dentin to HEMA. *Dent Mater* 2000; 16(1): 7-14.

Pashley DH, Tay FR, Yiu C, Hashimoto M, Breschi L, Carvalho RM, *et al.* Collagen degradation by host-derived enzymes during aging. *J Dent Res* 2004; 83(3): 216-21.

Perdigão J, Lambrechts P, Meerbeek B, Tome AR, Vanherle G, Lopes AB. Morphological field emission-SEM study of the effect of six phosphoric acid etching agents on human dentin. *Dent Mater* 1996; 12(4): 262-71.

Perdigão J, Lopes M, Geraldeli S, Lopes GC, García-Godoy F. Effect of a sodium hypochlorite gel on dentin bonding. *Dental Materials* 2000; 16(5): 311-23.

Pereira PN, Bedran-de-Castro AK, Duarte WR, Yamauchi M. Removal of noncollagenous components affects dentin bonding. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2006.

Phrukkanon S, Burrow MF, Tyas MJ. The effect of dentine location and tubule orientation on the bond strengths between resin and dentine. *J Dent* 1999; 27(4): 265-74.

Pioch T, Staehle HJ, Wurst M, Duschner H, Dorfer C. The nanoleakage phenomenon: influence of moist vs dry bonding. *J Adhes Dent* 2002; 4(1): 23-30.

Pollack BF. Class II composites: 1987 thoughts and techniques. *N Y State Dent J* 1987; 53(5): 25-7.

Prati C, Pashley DH, Montanari G. Hydrostatic intrapulpal pressure and bond strength of bonding systems. *Dent Mater* 1991; 7(1): 54-8.

Prati C, Ferrieri P, Galloni C, Mongiorgi R, Davidson CL. Dentine permeability and bond quality as affected by new bonding systems. *J Dent* 1995; 23(4): 217-26.

Reis AF, Arrais CAG, Novaes PD, Carvalho RM, De Goes MF, Giannini M. Ultramorphological analysis of resin-dentin interfaces produced with water-based single-step and two-step adhesives: nanoleakage expression. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2004; 71(1): 90-98.

Reis AF, Oliveira MT, Giannini M, De Goes MF, Rueggeberg FA. The effect of organic solvents on one-bottle adhesives' bond strength to enamel and dentin. *Oper Dent* 2003; 28 (6): 700-6.

Reis AF, Giannini M, Pereira PN. Long-term TEM analysis of the nanoleakage patterns in resin-dentin interfaces produced by different bonding strategies. *Dental Mater* 2006, doi: 10.1016/j.dental.2006.10.006.

Reis AF, Giannini M, Pereira PN. Influence of water-storage time on the sorption and solubility behavior of current adhesives and primer/adhesive mixtures. *Oper Dent* 2007 (In Press).

Retief DH. Effect of conditioning the enamel surface with phosphoric acid. *J Dent Res* 1973; 52(2): 333-41.

Sano H, Shono T, Takatsu T, Hosoda H.. Microporous dentin zone beneath resin-impregnated layer. *Oper Dent*. 1994; 19 (2): 59-64.

Sano H, Takatsu T, Ciucchi B, Homer JA, Matthews WG, Pashley DH. Nanoleakage within the hybrid layer. *Oper Dent* 1995; 20(1): 18-25.

Sano H, Yoshiyama M, Ebisu S, Burrow MF, Takatsu T, Ciucchi B *et al.*, Comparative SEM and TEM observations of nanoleakage within the hybrid layer. *Oper Dent* 1995a; 20(4): 160-7.

Sano H, Yoshikawa T, Pereira PN, Kanemura N, Morigami M, Tagami J *et al.* Long-term durability of dentin bonds made with a self-etching primer, *in vivo*. *J Dent Res* 1999; 78(4): 906-11.

Sigal MJ, Aubin JE, Ten Cate AR e Pitaru S. The odontoblast process extend to the dentinoenamel junction: an immunocytochemical study of rat dentine. *J Histochem Cytochem* 1984; 32(8): 872-7.

Spencer P, Swafford JR. Unprotected protein at the dentin-adhesive interface. *Quintessence Int* 1999; 30(7): 501-7.

Suzuki T, Finger WJ. Dentin adhesives: site of dentin vs. bonding of composite resins. *Dent Mater* 1988; 4(6): 379-83.

Tanaka J, Ishikawa K, Yatani H, Yamashita A, Suzuki K. Correlation of dentin bond durability with water absorption of bonding layer. *Dent Mater J* 1999; 18(1): 11-8.

Tatsumi T, Inokoshi S, Yamada T, Hosoda H. Remineralization of etched dentin. *J Prosthet Dent* 1992; 67(5): 617-20.

Tay FR, Pashley DH. Aggressiveness of contemporary self-etching systems. I: Depth of penetration beyond dentin smear layers. *Dent Mater* 2001; 17(4): 296-308.

Tay FR, Pashley DH. Dentine adhesives: have they become too hydrophilic. *J Can Dent Assoc* 2003; 69 (11): 724-31.

Tay FR, Hashimoto M, Pashley DH, Peters MC, Lai SC, Yiu CK, Cheong C. Aging affects two modes of nanoleakage expression in bonded dentin. *J Dent Res* 2003a; 82(7): 537-41.

Thomas, HF. The Effect of Various Fixatives on the Extent of the Odontoblast Process in Human Dentine. *Archs Oral Biol* 1983; 28(5): 465-9.

Tjäderhane L, Larjava H, Sorsa T, Uitto VJ, Larmas M, Salo T. The activation and function of host matrix metalloproteinases in dentin matrix breakdown in caries lesions. *J Dent Res* 1998; 77(8): 1622-9.

Van Meerbeek B, Inokoshi S, Braem M, Lambrechts P, Vanherle G. Morphological aspects of the resin-dentin interdiffusion zone with different dentin adhesive systems. *J Dent Res* 1992; 71(8): 1530-40.

Van Meerbeek B, Dhem A, Goret-Nicaise, Braem, M, Lambrechts P, Vanherle G. Comparative SEM and TEM examination of the ultrastructure of the resin-dentin interdiffusion zone. *J Dent Res* 1993; 72(2): 495-501.

Walshaw PR, McComb D. Clinical considerations for optimal dentinal bonding. *Quintessence Int* 1996; 27: 619-25.

Watanabe I, Nakabayashi N, Pashley DH. Bonding to ground dentin by a phenyl-p self-etching primer. *J Dent Res* 1994; 73: 1212-20.

Wiesmann HP, Meyer U, Plate U, Hohling HJ. Aspects of collagen mineralization in hard tissue formation. *Int Rev Cytol* 2005; 242: 121-56.



## Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

As informações contidas neste, foram fornecidas pelo Dr. Marcos Kirihata (9720-4766) e Dr. Saulo Geraldeli (6464-1769, 9756-7467), objetivando firmar acordo por escrito, com pleno conhecimento da natureza, dos procedimentos e dos riscos que será submetido, com a capacidade de livre arbítrio e sem qualquer coação.

1) *Título da pesquisa:* “**Avaliação ultra-morfológica da remineralização do colágeno não-infiltrado pelo adesivo resinoso em interfaces adesivas**”.

2) *Objetivo principal:* Avaliar a remineralização do colágeno (um dos constituintes da dentina humana) nas interfaces adesivas em dentes humanos íntegros em função tempo de permanência no meio bucal.

3) *Justificativa:* o condicionamento com ácido fosfórico pode levar à uma degradação/degeneração do colágeno quando se faz uma restauração e prejudicar sua sobrevida no meio bucal. Os estudos feitos em dentes extraídos nem sempre reproduzem o que ocorre no meio bucal.

4) *Procedimentos:* Serão feitas radiografias, fotografias e profilaxia dos dentes. Após a anestesia local, cada dente receberá dois preparos cavitários e a aplicação de um material restaurador. Após o período de 6 meses, o dente irá receber uma nova restauração e será extraído da boca.

5) *Desconfortos e riscos esperados:* necessidade de um tempo de atendimento maior em razão da execução dos procedimentos clínicos restauradores. Contudo, não é condição necessária para a exodontia a realização da restauração, mas única e exclusivamente para a participação na pesquisa.

6) *Benefícios para os voluntários:* resolução do problema na medida em que os elementos dentais serão removidos sem custos. Agendamento de consultas para avaliação e aplicação de medidas preventivas (orientação sobre higiene bucal, profilaxia e aplicação tópica de flúor) e do tratamento restaurador quando necessários. O paciente terá assistência por um período de até 6 meses após a exodontia.

7) *Obrigações dos voluntários:* A principal obrigação será a de comparecer às consultas nos dias agendados que, no máximo, necessitará de duas para cada dente.

8) *Informações adicionais:* os responsáveis têm a garantia que receberão respostas as suas perguntas e esclarecimento das dúvidas sobre o estudo (riscos, benefícios, andamento e resultados) sempre que solicitado ou preciso. Os voluntários não serão identificados sob quaisquer circunstâncias.

9) *Retirada do consentimento:* Os responsáveis têm a liberdade de retirar o seu consentimento a qualquer momento, deixando de participar do estudo.

Eu, \_\_\_\_\_, certifico que, tendo lido as informações prévias, sido suficientemente esclarecido pelos responsáveis do projeto sobre todos os itens e, estando plenamente de acordo com os mesmos, autorizo a realização da pesquisa e a publicação dos resultados obtidos na mesma, bem como faço a doação elementos dentais extraídos.

Guarulhos, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.

Nome legível: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

número do RG \_\_\_\_\_

---

Nome, RG, CRO e assinatura do Responsável pelo atendimento

---

Nome: Saulo Geraldeli, RG 11.363.978, CRO 37021 e assinatura do Responsável pela Pesquisa

Endereço residencial para contato com o Pesquisador Responsável:

Rua Francisco Lamas, 55, Apto 504, Torre 4

CEP 07023-070, Mogi das Cruzes, SP, Tel.: 4799-5220

*Elaborado com base na Resolução 196/1996 do Conselho Nacional de Saúde/ Ministério da Saúde, publicada no Diário Oficial, 10/10/1996, Brasília.*

## Anexo 2



Guarulhos, 07 de novembro de 2005.

Exmo. Sr.  
Prof. Saulo Geraldeli

**• PARECER Nº 11/2005**

Referência: **Aprovação de Projeto**  
**SISNEP/96** - "Avaliação ultra-morfológica da remineralização do colágeno não-infiltrado pelo adesivo resinoso em interfaces adesivas"

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Guarulhos analisou o Projeto de Pesquisa de sua autoria "Avaliação ultra-morfológica da remineralização do colágeno não-infiltrado pelo adesivo resinoso em interfaces adesivas" - SISNEP/96, na reunião de 07.11.2005, e no uso das competências definidas na Res. CNS 196/96, considerou o Projeto acima **aprovado**.

As orientações abaixo devem ser consideradas pelo Pesquisador Responsável durante a realização da pesquisa, visando que a mesma se desenvolva respeitando os padrões éticos:

- O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado.
- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou, aguardando seu parecer, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade de regime oferecido a um dos grupos da pesquisa que requeiram ação imediata.
- Eventuais modificações ou emendas e eventos adversos ao protocolo, devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas.
- Esclarecemos a necessidade da apresentação de relatório final até **31.10.2006**.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Luciene Cristina de Figueiredo'.

Luciene Cristina de Figueiredo  
Coordenadora do Comitê de Ética em  
Pesquisa