



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DONTOLOGIA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: ENDODONTIA**

GABRIELA SANTOS FELIPPE

**ANÁLISE DA INTERAÇÃO DO MTA
E DO ÁCIDO CLORÍDRICO COM A DENTINA**

**FLORIANÓPOLIS
2016**

Gabriela Santos Felipe

**ANÁLISE DA INTERAÇÃO DO MTA
E DO ÁCIDO CLORÍDRICO COM A DENTINA**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da UFSC, área de concentração Endodontia, para obtenção do título de Doutor em Odontologia. Área de concentração: Endodontia

Orientador: Prof. Dr. Wilson Tadeu Felipe

Florianópolis
2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária
da UFSC.

Felippe, Gabriela Santos

Análise da Interação do MTA e do Ácido Clorídrico com a Dentina /
Gabriela Santos Felippe ; orientador, Wilson Tadeu Felippe – Florianópolis, SC,
2015

69 p.

Tese (Doutorado). Universidade Federal de Santa Catarina. Centro de
Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Odontologia.

Inclui referência

1. Odontologia. 2. Ácido clorídrico. 3. dentina desmineralizada. 4. dentina
intertubular. 5. desmineralização dentinária. I. Felippe, Wilson Tadeu. II.
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em
Odontologia. III. Título.

Gabriela Santos Felipe

**ANÁLISE DA INTERAÇÃO DO MTA E DO ÁCIDO
CLORÍDRICO COM A DENTINA**

Esta tese foi julgada adequada para obtenção do Título de “Doutor” e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia.

Florianópolis, 25 de Fevereiro de 2016.

Profa. Dra. Izabel Cristina Santos Almeida
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Odontologia

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Wilson Tadeu Felipe
Presidente

Dr^a. Gabriela Romanini Basso
Membro externo

Dr. Eduardo Roberty Coutinho Rodrigues
Membro externo

Prof^a. Dr^a. Beatriz Dulcineia Mendes de Souza
Membro interno

Prof^a. Dr^a. Cleonice da Silveira Teixeira
Membro interno

Prof. Dr. Eduardo Antunes Bortoluzzi
Membro interno

Ao maior e mais grandioso sentimento do mundo.

Ao amor. A Deus.

Este trabalho tem dedicação especial aos meus pais e à minha família, que me deram tudo que eu precisava pra estar aqui e ser quem eu sou.

Sou eternamente grata a vocês e por vocês.

“Não há maior didática para os filhos que a do exemplo:
as palavras se ofuscam ante à reluzente verdade das
vivências;
as teorias se encolhem perante a amplitude dos fatos”.

Joan Garriga

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

*A Deus, pela maravilhosa graça da Vida.
Por Seu cuidado diário e Seu amor
que transcende nosso entendimento.
Por todas as bênçãos que tem me concedido
e por me ensinar a ser grata
todas as manhãs.*

*Aos MEUS PAPIS, simplesmente
por TUDO que são. Por terem me dado
a Vida e tudo que me veio através de vocês.
Honro a vocês pelo que são e pelo que me
deram. Obrigada pelo incentivo, pela paciência,
atenção e dedicação. Pelos ensinamentos dentro
e fora do âmbito profissional.
Por seu amor, e por se calarem quando
muitas vezes quiseram gritar.
Agora eu sigo, mas tenham certeza
de que absolutamente nada foi em vão.
Tomo tudo que me deram,
com muito amor e gratidão.*

AGRADECIMENTOS

Ao **Prof. Dr. Wilson Tadeu Felipe**, *meu papí* e orientador. Tuas ideias, tua capacidade, teu empenho e inteligência fazem tudo ficar menos complicado. És grande espelho não só pra mim, mas pra todos que te rodeiam e têm o privilégio de conviver contigo. Tua dedicação e disciplina inspiram a todos. Te amo muito +QD+!

À minha mamis e eterna orientadora, **Profa. Dra. Mara Cristina Santos Felipe**. Pelo maior exemplo de dedicação que eu conheço, por tua inteligência e perfeccionismo. Pelo teu amor. Pela disponibilidade a todo momento, com tudo e com todos... muitas vezes mais do que para contigo mesma. Desejo que vivas no maior amor do mundo todos os dias da tua vida.

Ao meu irmão **André**. Admiro demais tua inteligência e fico muuuito feliz de te ver indo atrás dos teus objetivos. Continue com muito foco e determinação! Tenho certeza que teu caminho será muito lindo e frutuoso.

À minha parceira de pesquisa, **Morgane**, pela disponibilidade de sempre, pela humildade e sede de saber. Não tenhas dúvidas que tudo ficou mais fácil com a tua ajuda e, claro, com a tua companhia para dividir os questionamentos e todas as zicas que nos perseguiram durante esse tempo hahahah Muito sucesso pra ti nessa nova etapa!! Que Deus te ilumine sempre!

Ao **Tamer**, nosso colega de doutorado, pela disponibilidade para operar o MEV, passando loongas tardes naquela salinha em frente ao computador...inclusive nos dias lindos de sol em véspera de Natal e véspera de Carnaval!!! Que sejas vitorioso

em tudo que almejares na tua vida. Tua capacidade e comprometimento te levarão onde desejares!!

Às companheiras de mestrado e depois de doutorado **José, Lu, Maybell**. Desejo a vocês um caminho muito iluminado, cheio de conquistas. Que vocês colham os frutos das tantas sementes que plantaram nesse tempo e sejam muito realizadas. Tenho certeza que Deus guarda algo muito especial para cada uma de vocês.

Às meninas do Mestrado A e B kkkk **Jane, Gabi, Náira**. Que o interesse de vocês pela academia se multiplique e a sede de saber cresça e se desenvolva cada vez mais. Muita sorte em suas caminhadas!!!!

À **Profa. Dra. Maria Helena Pozzobon**, pelo legado que deixaste em nossa disciplina. Seu jeitinho conquista e faz falta a todos que tinham o privilégio de conviver diariamente contigo.

À **Profa. Dra. Ana Maria H. Alves**, que, com sua simplicidade e dedicação, respeito e compaixão faz a diferença e agrega aos nossos dias.

Ao **Sérgio**, por toda tua ajuda e serviço a todos que de ti precisam. És e sempre serás muito importante pra todos que convivem contigo. À **Marly**, sempre disposta a ajudar e explicar os detalhes laboratoriais hehehe Tenham a certeza que fazem a diferença no nosso ambiente de trabalho. Só tenho coisas boas pra lhes desejar.

Ao **Programa de Pós-graduação em Odontologia da UFSC**, por sua busca constante em aprimorar nossas condições de trabalho e formar acadêmicos de qualidade.

Ao profissionais do LCME que estivemos em contato durante este período, **Eliane** e **Eduardo**. Um muuuuito obrigada por sua disponibilidade em nos ajudar e tirar todas as dúvidas durante a análise em MEV. Que durante suas caminhadas encontrem pessoas tão prestativas quanto vocês foram para nós. Minha gratidão aos dois!

À **Profa. Dra. Beatriz D. M. de Souza**. Bea, és uma pessoa muito querida e uma profissional excelente. Tua beleza está dentro e fora de ti. Você inspira muita gente, continue com esse seu jeitinho. Tenho certeza que terás as maiores recompensas que a vida pode lhe oferecer. Obrigada por aceitar o convite para a banca.

À **Profa. Dra. Cleonice da Silveira Teixeira**, por estar sempre pronta pra tirar alguma dúvida ou opinar em algo pra melhorar a execução da pesquisa. Pela disponibilidade e interesse em participar da minha banca. Você é especial, divertida e tem um jeitinho único!

Ao **Prof. Dr. Eduardo Antunes Bortoluzzi**. Meus agradecimentos pelo interesse em deixar este trabalho mais rico e interessante com sua experiência e conhecimento. Estivemos juntos no Mestrado e agora também no Doutorado!

Ao **Dr. Eduardo Roberty Coutinho Rodrigues**, o Dudu. Meu professor, meu colega, meu amigo, e agora minha banca. Quanta alegria te ter comigo para fechar esse ciclo da minha caminhada. Tenho certeza que estaremos juntos pra mais mil realizações de vida. Meu muuuuito obrigada pelo teu deslocamento. É uma honra te ter aqui! Obrigada pela parceria de sempre, és muito especial na minha vida!

À **Dra. Gabriela Romanini Basso**, minha xará **Gabizinha**. Não tenho palavras pra expressar minha felicidade e realização por estares fazendo parte desse meu momento. Tenho muito orgulho de tí, e de quem te tornaste. Pedirei a Deus que te ilumine sempre e abençoe a nossa linda amizade. És muito importante pra mim, e te agradeço de coração por vires contribuir com meu trabalho.

Aos **amigos da vida**, que fora do ambiente acadêmico me ajudam a cada dia a escrever as páginas da minha vida, da maneira mais leve e mais linda possível. Agradeço a Deus pela vida de vocês pois vocês fazem toda a diferença na minha!!!

Ao **Léozito**. O presente que Deus me deu sem avisar, sem eu ter pedido. Que me conquistou de uma maneira que eu jamais poderia imaginar. Pelo carinho, pelo incentivo, pelos cafés da manhã, pelas massagens, pela admiração, pelo olhar apaixonado, pelo jeitinho incrível, pelos abraços envolventes e pela nossa bolha. Meu maior, melhor e mais lindo presente. Pelo encontro de almas. Pelo despertar de um sentimento tão rápido e tão intenso, tão puro e tão complexo, tão simples e tão completo, tão mágico e tão real. Oro a Deus para que Ele nos conceda a sabedoria do equilíbrio, para que essa relação continue crescendo na equivalência. Obrigada, obrigada e obrigada! Te amo.

**A todos que estiveram comigo, de algum jeitinho
guiando meu caminhar e torcendo
pela minha conquista.**

Olhe com a alma e você verá tudo que precisa ser visto.

“Entrega teu caminho ao senhor, confia nele, e o mais ele fará”.
SI 37:5

*“A alegria não chega apenas no encontro do achado,
mas faz parte do processo da busca.
E ensinar e aprender não pode dar-se fora da procura,
fora da boniteza e da alegria”.*
Paulo Freire

*“Só sabemos com exatidão
quando sabemos pouco;
à medida que vamos adquirindo conhecimento,
instala-se a dúvida”.*
Johann Goethe

A presente tese será apresentada na forma de artigo científico, conforme estabelecido no detalhamento do artigo 51, item 03, do regimento do PPGO, 2012, e complementa o artigo desenvolvido durante o curso de Mestrado intitulada “**Análise da Interface Bioagregados-Dentina: Estudo *In Vivo***” (Apêndice A).

FELIPPE, G.S. **Análise da Interação do MTA e do Ácido Clorídrico Com a Dentina**. 2016. 47f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-graduação em Odontologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar, de forma subjetiva, o aspecto estrutural da dentina após desmineralização com ácido clorídrico (HCl) 6M e 12M, com ou sem interação prévia com MTA/PBS, e identificar, quando necessário, os elementos constituintes da estrutura remanescente. A partir de 6 dentes bovinos, foram obtidos 24 discos de dentina com aproximadamente 2 mm de espessura, os quais foram distribuídos, aleatoriamente em 3 grupos experimentais (n = 8). Nos discos do Grupo 1, o espaço referente ao canal radicular foi preenchido com MTA e os discos permaneceram em contato com tampão fosfatossalino (PBS) por 30 dias. Em seguida, foi realizada a fixação dos discos, o embutimento em resina, o polimento e a desmineralização com HCl 6M por 30 seg, para posterior análise em microscopia eletrônica de varredura (MEV). Nos discos dos grupos 2 e 3, o espaço do canal permaneceu vazio. Após o embutimento em resina e polimento, foi feita a fixação e posterior desmineralização, por 30 seg, com HCl na concentração de 6M e 12M respectivamente. Todos os discos foram, então, preparados para avaliação em MEV e energia dispersiva de Rx (EDX) para verificar as alterações estruturais ocorridas na dentina, bem como a composição química de algumas das estruturas visualizadas. O HCl promoveu perda de grande parte da dentina intertubular e, em menor grau, da dentina peritubular. As maiores alterações foram evidenciadas nas amostras do Grupo 3. Foi possível concluir que: o aspecto estrutural da dentina após a desmineralização com HCl 6M e 12M mostrou-se similar, independentemente da interação prévia com MTA/PBS; as alterações estruturais foram mais evidentes nas amostras tratadas com HCl 12M, e a análise em MEV-EDX revelou que a composição das estruturas remanescentes era compatível com a da dentina.

Palavras-chave: Ácido clorídrico, dentina desmineralizada, dentina intertubular, dentina peritubular, desmineralização dentinária, microscopia eletrônica de varredura.

ABSTRACT

The aim of this study was to analyze the morphological appearance of the dentin surface after demineralization with 6M e 12M chloride acid (HCl), with or without previous interaction with MTA/PBS, and to identify the remnants composition. **Methods:** Twenty-four 2 mm dentin discs were obtained from 6 bovine teeth, and randomly divided into 3 experimental groups (n = 8). In discs of group 1, the cavities were filled with MTA and the discs were immersed in PBS. After 30 days, they were fixed, embedded in epoxy resin, polished and demineralized with 6M HCl for 30 sec, for further scanning electron microscopy (SEM) analysis. In discs of groups 2 and 3, the cavities remained empty. After embedment and polishment, they were fixed and demineralized, for 30 sec, with 6M e 12M HCl, respectively. All discs were then prepared for SEM and SEM-EDX analysis to verify morphological modifications on dentin surface and the elemental composition of some structures. **Results:** The HCl led to a great loss of intertubular dentin and part of the peritubular one. The greater modifications were observed in group 3. **Conclusions:** The morphological appearance of dentin after demineralization with 6M e 12M HCl was similar, despite the previous interaction with MTA/PBS; the structural modifications were more significant in the samples treated with 12M HCl; and SEM-EDX analysis showed the composition of the remnants structures was similar to dentin.

Keywords: Chloride acid, demineralized dentin, dentin demineralization, intertubular dentin, peritubular dentin, scanning electron microscopy.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Imagens de fotomicrografias da superfície dentinária do G1 (A), G2 (B) e G3 (C). A Fig 1D mostra, em maior aumento, a exposição das paredes dos túbulos dentinários íntegras (*) e fraturadas/deslocadas (*). A Fig. 1E apresenta espectros de EDX mostrando a similaridade entre as estruturas avaliadas (áreas demarcadas em D * *),.....	41
Figura 2.	Imagens de fotomicrografias da região da interface entre o lúmen do canal e a parede dentinária mais interna em amostras do G2 (A) e G3 (B). Observar a presença da camada lisa e homogênea (♦). A Fig 2C apresenta os espectros de EDX das áreas demarcadas em 2A e 2B (resina ♦, camada ♦),.....	42
Figura 3.	Espectros de EDX das superfícies dentinárias das amostras do G1 (A), G2 (B) e G3 (C) mostrando similaridade nas composições.....	43
Figura 4.	Imagens de fotomicrografias revelando maior perda de dentina peri e intertubular nas amostras tratadas com HCl 12M (B) do que 6M (A).....	44

APÊNDICE A

Figure 1.	Photomicrographs of the MTAF-dentin interface at 7 (A), 15 (B , C), 30 (E) and 90 (F) days. Structures resembling mineral deposition on the dentin surface and in the interior of the dentinal tubules can be observed (+) . (D) EDX spectrum revealing the chemical composition and the Ca/P ratio of the intratubular mineral deposition observed in C . Photomicrographs of the iRoot-dentin (G), BA-dentin (H) and MTAB-dentin (I) interfaces. Photomicrograph of the dentin from an empty tube (J).....	63
Figure 2.	Photomicrographs of the MTAF-dentin (A), iRoot-dentin (E) and BA-dentin interfaces (H) from the 7-day period. EDX spectrum of the marked areas in A : intratubular mineral deposition (+) (B), dentin (♦)	

(C) and material (●) (D). EDX spectrum of the marked area (*) in E: supposed interfacial layer (F). EDX spectrum of the marked area (★) in E: iRoot (G). Photomicrograph showing BA in the dentinal tubules (H)..... 64

Figure 3. Photomicrograph of BA-dentin interface from the 15-day period (A). EDX spectrum of the marked areas in A: + (B) and ◆ (dentin) (C). Photomicrograph of the dentin from an empty tube (observe the intratubular mineral deposition-like features (*) (D). Photomicrograph (E) and EDX spectrum (F) of a crystal observed over the dentin.... 65

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	29
2. ARTIGO.....	33
Introdução.....	37
Material e métodos.....	38
<i>Obtenção e preparo das amostras</i>	38
<i>Divisão dos grupos</i>	38
<i>Microscopia eletrônica de varredura</i>	39
Resultados.....	39
Discussão.....	44
Conclusões.....	46
Referências.....	47
3. REFERÊNCIAS.....	51
4. APÊNDICE A.....	57

1 INTRODUÇÃO

A dentina pode ser definida como um composto biológico e estrutural complexo (MARSHALL, 1993; PASHLEY, 1996; GOLDBERG et al., 2011; BERTASSONI; STANKOSKA; SWAIN, 2012) e heterogêneo (PASHLEY, 1996; BERTASSONI; STANKOSKA; SWAIN, 2012). É descrita como um tecido mineralizado, elástico e avascular (XU & WANG, 2012), constitui a maior parte da estrutura dental, envolve a cavidade pulpar em posição central e sustenta o esmalte, compensando sua friabilidade (TEN CATE, 2013).

Estudos demonstraram que 50-70% da dentina é composta por estrutura mineral (principalmente hidroxiapatita) (MJOR & FEJERSKOV, 1979; DRIESSENS & VERBEECK, 1990; MARSHALL et al., 1997; BEDRAM-RUSSO et al., 2008; XU & WANG, 2012), 20% por matriz orgânica (quase exclusivamente colágeno tipo I) (BOSKEY, 1991; GOLDBERG & TAKAGI, 1993) e aproximadamente 10% por água (XU & WANG, 2012).

Esse tecido possui túbulos densamente agrupados que atravessam toda a sua espessura e contém as extensões citoplasmáticas dos odontoblastos, células que inicialmente o produziram e subsequentemente o mantém (PASHLEY, 1991; PASHLEY, 1996; HABELITZ et al., 2007; GOLDBERG et al., 2011; TEN CATE, 2013). Os odontoblastos e seus corpos se encontram alinhados ao longo da superfície interna da dentina, onde formam os limites periféricos da polpa dentária (TEN CATE, 2013). A presença de túbulos confere à dentina uma característica de barreira semi-permeável entre o esmalte/cimento e a polpa dental (PASHLEY, 1996; BERTASSONI et al., 2009).

Os túbulos dentinários são revestidos internamente pela dentina peritubular, que apresenta alto conteúdo mineral (95% vol.) e pouca matriz orgânica (proteínas não-colagenosas como as glicoproteínas, proteoglicanos e lipídios) (HABELITZ et al., 2007; GOTLIV & VEIS, 2009; GOLDBERG et al., 2011; BERTASSONI; STANKOSKA; SWAIN, 2012). Entre os túbulos dentinários está localizada a dentina intertubular, que é composta por uma matriz colagenosa com menor teor mineral (30% vol.) (PASHLEY, 1991; MARSHALL et al., 1993; GOTLIV & VEIS, 2009; GOLDBERG et al., 2011; BERTASSONI; STANKOSKA; SWAIN, 2012). Além dessa diferença, a dentina peritubular é lisa e densa, enquanto a intertubular se apresenta granulosa e desorganizada (GOTLIV & VEIS, 2009; BERTASSONI;

STANKOSKA; SWAIN, 2012). Essa diferença de composição química e estrutural resulta em um comportamento diverso das diferentes áreas da dentina frente ao processo de desmineralização (MARSHALL et al., 1993; MARSHALL et al., 1997).

Vários procedimentos em odontologia, tanto na prática clínica quanto na de pesquisa, preconizam a desmineralização da superfície dentinária por meio de condicionamento ácido (SAURO et al., 2010; TEZVERGIL-MUTLUAY et al., 2012). Nas pesquisas *ex vivo*, a solução de ácido clorídrico 6M é normalmente utilizada no preparo das amostras para estudo em microscopia eletrônica de varredura (MEV), com o intuito de permitir a observação ultraestrutural da dentina (PERDIGÃO, 1996).

O processo de desmineralização afeta tanto a dentina peri quanto a intertubular, provocando perda de conteúdo mineral e exposição de componentes orgânicos como a *lamina limitans*, filamentos e macromoléculas (THOMAS, 1984; BERTASSONI; STANKOSKA; SWAIN, 2012). A perda mineral promove aumento do diâmetro dos túbulos e, conseqüentemente, um aumento da permeabilidade, fator que pode ser determinante na adesão química e/ou mecânica de diferentes materiais à dentina desmineralizada (SAURO et al., 2010; HASHEMINIA et al., 2012; TEZVERGIL-MUTLUAY et al., 2013; AHUJA et al., 2014).

Nos estudos com materiais restauradores (FERRARI; VICHI; GRANDINI, 2001) e reparadores (SARKAR et al., 2005; REYES-CARMONA; FELIPPE; FELIPPE, 2009; REYES-CARMONA; FELIPPE; FELIPPE, 2010; DREGER et al., 2012), imagens obtidas por meio de MEV sugerem que a interação químico-mecânica entre esses materiais e a dentina resulta na formação de uma camada intermediária, e de prolongamentos (*tags*) que se projetam para o interior dos túbulos dentinários.

Em relação aos materiais reparadores (biomateriais) e de forma mais específica ao MTA, Reyes-Carmona, Felipe, Felipe (2009) verificaram, *in vitro*, que a interação do MTA-dentina-PBS resultou na deposição de apatita carbonatada na interface material/dentina e no interior dos túbulos dentinários. Os autores afirmaram que foi possível distinguir, por meio de MEV, estruturas tipo *tags* que lembravam a dentina peritubular desmineralizada. Outros autores também relataram a formação de uma intercamada e de projeções tipo *tags* para o interior dos túbulos dentinários (SARKAR et al., 2005; REYES-CARMONA; FELIPPE; FELIPPE, 2009; REYES-CARMONA; FELIPPE; FELIPPE, 2010; DREGER et al., 2012).

Ao estudar, *in vivo*, a interação de diferentes biomateriais com a dentina, Felipe (2012) também verificou a formação de estruturas similares à deposição mineral sobre a dentina e nos túbulos dentinários. Entretanto, a autora atentou para o fato de que tais estruturas, com composição semelhante à dentina adjacente, também foram encontradas nas amostras do grupo-controle, nas quais não foi utilizado qualquer biomaterial. Este achado levantou a hipótese de que a suposta deposição intratubular fosse, na verdade, parte da dentina peritubular exposta pela ação do ácido clorídrico empregado no preparo das amostras para MEV. Conforme a autora, é possível que, em alguns desses estudos prévios (SARKAR et al., 2005; REYES-CARMONA; FELIPPE; FELIPPE, 2009; DREGER et al., 2012) tenha havido falha na interpretação de algumas imagens, ou seja, que remanescentes da dentina peritubular tenham sido confundidos com deposição de apatita carbonatada no interior dos túbulos dentinários.

Diante do exposto, os objetivos deste estudo foram: i) avaliar, de forma subjetiva, o aspecto estrutural da dentina após desmineralização com ácido clorídrico 6M e 12M, com ou sem interação prévia com MTA/PBS; e ii) identificar, quando necessário, os elementos constituintes da estrutura remanescente.

2 ARTIGO

Análise da Interação do MTA e do Ácido Clorídrico Com a Dentina.

Gabriela Santos Felipe, DDS, MsC.

Departamento de Odontologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil.

Resumo

Introdução: O objetivo deste trabalho foi avaliar, de forma subjetiva, o aspecto estrutural da dentina após desmineralização com ácido clorídrico (HCl) 6M e 12M, com ou sem interação prévia com MTA/PBS, e identificar, quando necessário, os elementos constituintes da estrutura remanescente. **Métodos:** A partir de 6 dentes bovinos, foram obtidos 24 discos de dentina com aproximadamente 2 mm de espessura, os quais foram distribuídos, aleatoriamente em 3 grupos experimentais (n = 8). Nos discos do Grupo 1, o espaço referente ao canal radicular foi preenchido com MTA e os discos permaneceram em contato com tampão fosfato-salino (PBS) por 30 dias. Em seguida, foi realizada a fixação dos discos, o embutimento em resina, o polimento e a desmineralização com HCl 6M por 30 seg, para posterior análise em microscopia eletrônica de varredura (MEV). Nos discos dos grupos 2 e 3, o espaço do canal permaneceu vazio. Após o embutimento em resina e polimento, foi feita a fixação e posterior desmineralização, por 30 seg, com HCl na concentração de 6M e 12M respectivamente. Todos os discos foram, então, preparados para avaliação em MEV e energia dispersiva de Rx (EDX) para verificar as alterações estruturais ocorridas na dentina, bem como a composição química de algumas das estruturas visualizadas. **Resultados:** O HCl promoveu perda de grande parte da dentina intertubular e, em menor grau, da dentina peritubular. As maiores alterações foram evidenciadas nas amostras do Grupo 3. **Conclusões:** o aspecto estrutural da dentina após a desmineralização com HCl 6M e 12M mostrou-se similar, independentemente da interação prévia com MTA/PBS; as alterações estruturais foram mais evidentes nas amostras tratadas com HCl 12M, e a análise em MEV-EDX revelou que a composição das estruturas remanescentes era compatível com a da dentina.

Palavras-chave: Ácido clorídrico, dentina desmineralizada, dentina intertubular, dentina peritubular, desmineralização dentinária, microscopia eletrônica de varredura.

Abstract

Introduction: The aim of this study was to analyze the morphological appearance of the dentin surface after demineralization with 6M e 12M chloride acid (HCl), with or without previous interaction with MTA/PBS, and to identify the remnants composition. **Methods:** Twenty-four 2 mm dentin discs were obtained from 6 bovine teeth, and randomly divided into 3 experimental groups (n = 8). In discs of group 1, the cavities were filled with MTA and the discs were immersed in PBS. After 30 days, they were fixed, embedded in epoxy resin, polished and demineralized with 6M HCl for 30 sec, for further scanning electron microscopy (SEM) analysis. In discs of groups 2 and 3, the cavities remained empty. After embedment and polishment, they were fixed and demineralized, for 30 sec, with 6M e 12M HCl, respectively. All discs were then prepared for SEM and SEM-EDX analysis to verify morphological modifications on dentin surface and the elemental composition of some structures. **Results:** The HCl lead to a great loss of intertubular dentin and part of the peritubular one. The greater modifications were observed in group 3. **Conclusions:** The morphological appearance of dentin after demineralization with 6M e 12M HCl was similar, despite the previous interaction with MTA/PBS; the structural modifications were more significant in the samples treated with 12M HCl; and SEM-EDX analysis showed the composition of the remnants structures was similar to dentin.

Keywords: Chloride acid, demineralized dentin, dentin demineralization, intertubular dentin, peritubular dentin, scanning electron microscopy.

Introdução

Diversos procedimentos em odontologia, tanto na prática clínica quanto na de pesquisa, preconizam a desmineralização da superfície dentinária por meio de condicionamento ácido (PERDIGÃO, 1996; SAURO et al., 2010; TEZVERGIL-MUTLUAY et al., 2012). O processo de desmineralização afeta tanto a dentina peri quanto a intertubular, provocando perda de conteúdo mineral e exposição de componentes orgânicos (THOMAS, 1984; BERTASSONI; STANKOSKA; SWAIN, 2012).

Em alguns estudos com materiais restauradores (FERRARI; VICHI; GRANDINI, 2001) e com materiais reparadores (SARKAR et al., 2005; REYES-CARMONA; FELIPPE; FELIPPE, 2009; REYES-CARMONA; FELIPPE; FELIPPE, 2010; DREGER et al., 2012), imagens obtidas por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV) sugerem que a interação químico-mecânica entre esses materiais e a dentina resulta na formação de uma camada intermediária (SARKAR et al., 2005) e de prolongamentos (*tags*) (FERRARI; VICHI; GRANDINI, 2001; REYES-CARMONA; FELIPPE; FELIPPE, 2009; REYES-CARMONA; FELIPPE; FELIPPE, 2010; DREGER et al., 2012) que se projetam para o interior dos túbulos dentinários.

Em relação aos materiais reparadores (biomateriais) e de forma mais específica ao MTA, Reyes-Carmona, Felipe, Felipe (2009) verificaram, *in vitro*, que a interação do MTA-dentina-PBS resultou na deposição de apatita carbonatada na interface material/dentina e no interior dos túbulos dentinários.

Ao estudar, *in vivo*, a interação de diferentes biomateriais com a dentina, Felipe (2012) também verificou a formação de estruturas similares à deposição mineral sobre a dentina e no interior dos túbulos dentinários. Entretanto, a autora atentou para o fato de que tais estruturas, com composição semelhante à dentina adjacente, também foram encontradas nas amostras do grupo-controle, nas quais não foi utilizado qualquer biomaterial. Este achado levantou a hipótese de que a suposta deposição intratubular fosse, na verdade, parte da dentina peritubular exposta após a ação do ácido clorídrico empregado no preparo das amostras para MEV. Conforme a autora, é possível que, em estudos prévios (SARKAR et al., 2005; REYES-CARMONA; FELIPPE; FELIPPE, 2009; DREGER et al., 2012) tenha havido falha na interpretação de algumas imagens, ou seja, que remanescentes da dentina peritubular tenham sido confundidos com deposição de apatita carbonatada no interior dos túbulos dentinários.

Diante do exposto, os objetivos deste estudo foram: i) avaliar, de forma subjetiva, o aspecto estrutural da dentina após desmineralização com ácido clorídrico (HCl) 6M e 12M com ou sem interação prévia com MTA/PBS; e ii) identificar, quando necessário, os elementos constituintes das estruturas remanescentes.

Material e métodos

Obtenção e preparo das amostras

Foram utilizados 6 dentes unirradiculados, oriundos de bezerros, com idade aproximada de 30 meses, abatidos para fins comerciais. Após a extração, os dentes foram lavados em água destilada, raspados com curetas periodontais (Hu-Friedy, Rio de Janeiro, Brasil) e armazenados a 5°C em hipoclorito de sódio (NaOCl) 5% para desinfecção. As porções coronária e apical dos dentes foram removidas a fim de se obter tubos de dentina de aproximadamente 10 mm de comprimento. O espaço referente ao canal radicular foi ampliado com pontas diamantadas 4083 (Microdont, São Paulo, Brasil).

Após a esterilização, 4 discos de dentina de 2 mm de espessura foram obtidos a partir de cada tubo ($n = 24$) com auxílio da máquina de corte Isomet (Buehler, Lake Bluff, Estados Unidos). Em seguida, os discos foram imersos em EDTA 17% por 3 min e NaOCl 2% por mais 3 min para remoção da lama dentinária. Então, foram lavados com água destilada, secos, e separados em grupos conforme descrito a seguir.

Divisão dos grupos

Os 24 discos de dentina foram divididos aleatoriamente em 3 grupos ($n = 8$):

Grupo 1

Nos discos desse grupo, o espaço do canal foi preenchido com MTA (Angelus Soluções Odontológicas, PR, Brasil), o qual foi manipulado seguindo as orientações do fabricante. Estes discos foram imersos em tampão fosfato-salino (PBS) (pH 7,2), e permaneceram em estufa a 37°C por 30 dias, sendo que a solução de PBS foi trocada a cada 5 dias.

Passados os 30 dias, os discos foram removidos do PBS, lavados em água destilada, fixados em solução de glutaraldeído 2,5% tamponado com cacodilato 0,2M por 12 h a 4°C, lavados em solução tampão cacodilato 0,2 M durante 1 h com 2 trocas, seguida de uma

breve lavagem com água destilada, e desidratados em concentrações crescentes de álcool etílico (50-100%).

Após a desidratação, os discos foram embutidos em resina epoxi, e decorrido o tempo de polimerização da resina (± 18 h), uma das superfícies do disco foi polida com lixas de papel d'água de granulações decrescentes (600-1200) e disco de feltro com pastas de polimento (0,5 e 0,03 μ). Em seguida, os discos foram levados ao ultrassom em álcool etílico absoluto por 5 min. Após a secagem, foram imersos em HCl 6M por 30 seg, brevemente lavados em água destilada, imersos em NaOCl 2% por 10 min e em água destilada pelo mesmo período de tempo. Os discos, então, permaneceram em estufa a 37°C durante 48 h.

Grupos 2 e 3

Nos discos desses grupos não foi usado qualquer material para o preenchimento do espaço do canal radicular. Logo após a remoção da lama dentinária, foi feito o embutimento em resina epoxi, fixação e desidratação como citado anteriormente para o Grupo 1. Terminada a desidratação, os discos foram imersos por 30 seg em HCl 6M (Grupo 2) e em HCl 12M (Grupo 3), brevemente lavados em água destilada, imersos em NaOCl 2% por 10 min e em água destilada pelo mesmo período de tempo, e colocados em estufa a 37°C durante 48 h.

Microscopia eletrônica de varredura

Após a secagem, as superfícies a serem analisadas foram recobertas com uma camada de ouro de 300 Å e analisadas por meio de um microscópio eletrônico de varredura (Philips SEM XL 30; Philips, Eindhoven, Netherlands), operando com 10 Kv.

Com o propósito de avaliar o aspecto estrutural da dentina após a desmineralização, áreas da dentina referentes a interface e próximas a ela foram analisadas em aumentos de 200-3000x. Em algumas amostras, a composição química da dentina e do material foi analisada por energia dispersiva de Rx (EDX) a fim de registrar os principais elementos químicos constituintes e possibilitar a diferenciação das estruturas observadas.

Resultados

De forma geral, foi observado que a superfície dentinária de todas as amostras apresentava-se desmineralizada, com perda de grande parte da dentina intertubular, e perda em menor grau da dentina peritubular (Figs. 1A, 1B e 1C), evidenciando a parede dos túbulos

dentinários. A maioria dessas paredes apresentava-se íntegra, e algumas “fraturadas/deslocadas” (Fig. 1D). A análise elemental revelou que as estruturas avaliadas tinham composições similares (Fig. 1E).

A partir da análise das fotomicrografias obtidas em MEV, foi possível observar, em amostras dos Grupos 2 e 3, a presença de uma camada lisa e homogênea na região da interface entre o lúmen do canal e a parede dentinária mais interna (Figs. 2A e 2B). Por meio da análise em MEV-EDX foi possível verificar que a composição elemental dessa camada e da resina era similar (Fig. 2C).

A interação prévia da dentina com MTA/PBS (Grupo 1) não resultou em alterações estruturais e/ou modificações no resultado da análise elemental quando comparado com o das amostras dos Grupos 2 e 3 (Fig. 3).

Nas amostras do Grupo 3 (HC112M), a perda de dentina inter e peritubular foi mais evidente (Fig. 4).

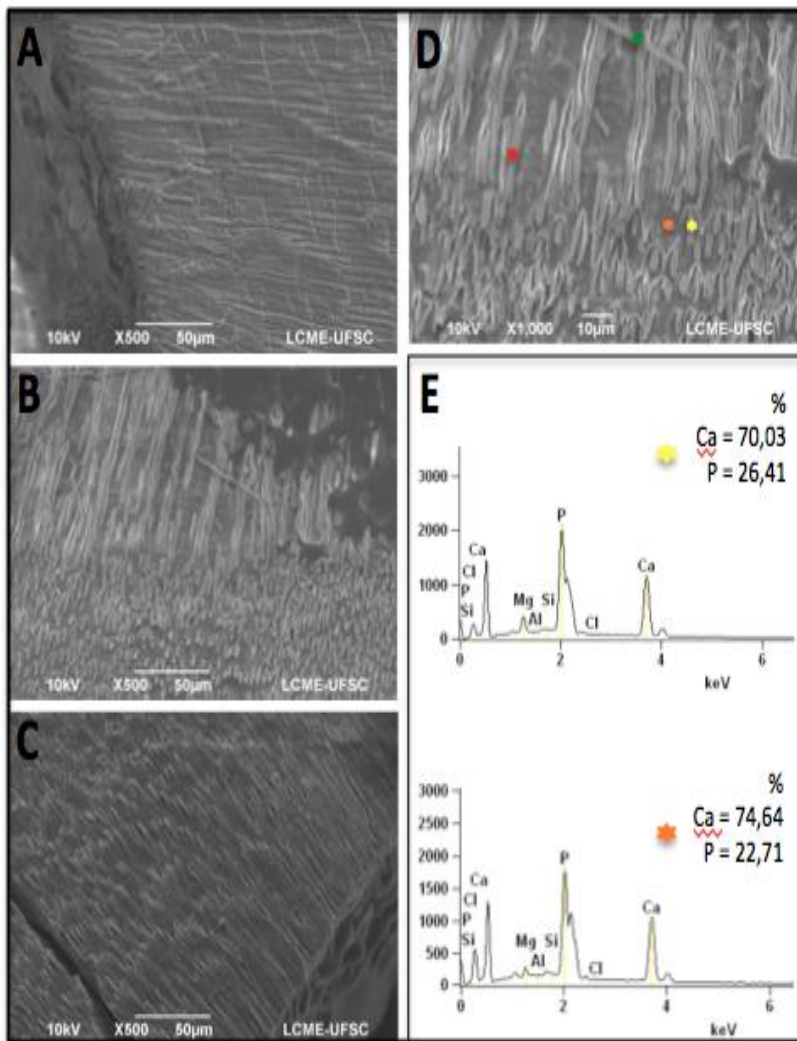


Figura 1. Imagens de fotomicrografias da superfície dentinária do G1 (A), G2 (B) e G3 (C). A Fig 1D mostra, em maior aumento, a exposição das paredes dos túbulos dentinários íntegras (*) e fraturadas/deslocadas (*). A Fig. 1E apresenta espectros de EDX mostrando a similaridade entre as estruturas avaliadas (áreas demarcadas em D ***)

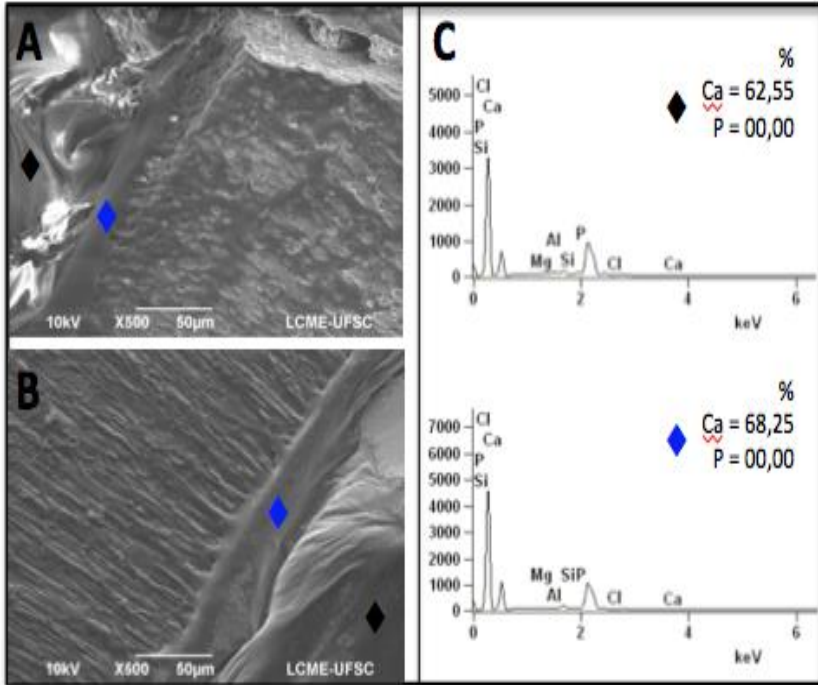


Figura 2. Imagens de fotomicrografias da região da interface entre o lúmen do canal e a parede dentinária mais interna em amostras do G2 (A) e G3 (B). Observar a presença da camada lisa e homogênea (♦). A Fig 2C apresenta os espectros de EDX das áreas demarcadas em 2A e 2B (resina ♦, camada ♦).

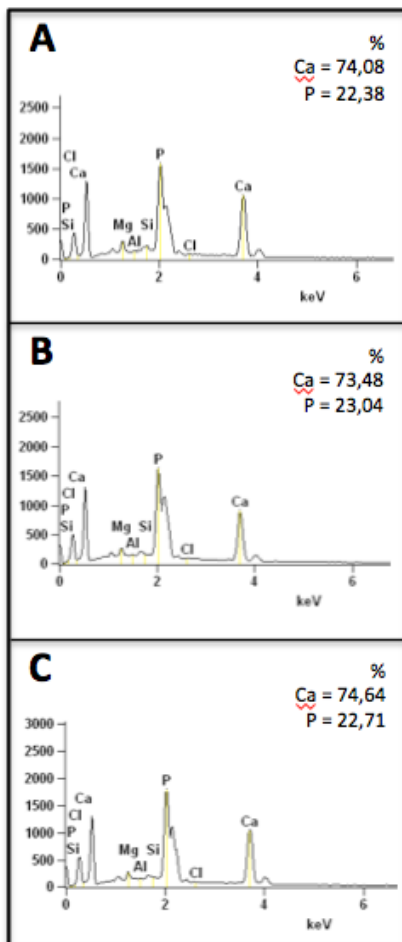


Figura 3. Espectros de EDX das superfícies dentinárias das amostras do G1 (A), G2 (B) e G3 (C) mostrando similaridade nas composições.

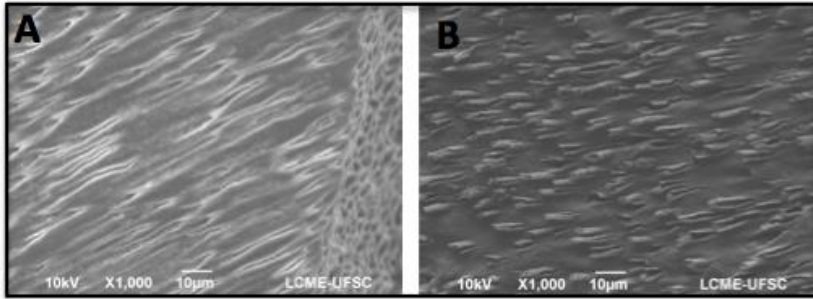


Figura 4. Imagens de fotomicrografias revelando maior perda de dentina peri e intertubular nas amostras tratadas com HCl 12M (**B**) do que 6M (**A**).

Discussão

A utilização da MEV como ferramenta para estudar dentina desmineralizada é bem fundamentada na literatura. A metodologia de preparo para visualização das amostras utilizada neste estudo foi proposta por Perdigão (1996), e validada posteriormente por outros autores (REYES-CARMONA; FELIPPE; FELIPPE, 2009; DREGER et al., 2012). A análise em EDX tem sido empregada para avaliar a composição elemental das estruturas visualizadas no microscópio eletrônico de varredura (REYES-CARMONA; FELIPPE; FELIPPE, 2009; REYES-CARMONA; FELIPPE; FELIPPE, 2010; DREGER et al., 2012).

O uso de dentes humanos para fins de estudo está cada vez menos frequente. Além de dificuldades com a sua obtenção, o número amostral, a qualidade, a padronização anatômica e questões éticas restringem sua utilização. Para que não haja prejuízo nas pesquisas científicas, é interessante que se tenha alternativas aos dentes humanos. Neste estudo, foram utilizados dentes bovinos, pois já foi comprovado que a dentina bovina apresenta semelhança morfológica, mecânica e bioquímica com a dentina humana (SCHILKE et al., 2000; FONSECA et al., 2008; CASTANHO, 2010; KATO et al., 2011).

A análise das imagens de todas as amostras revelou que o HCl, empregado no preparo para MEV, promoveu perda de grande parte da dentina intertubular e, em menor grau, da dentina peritubular, corroborando resultados de estudos anteriores

(MARSHALL et al., 1993; PASHLEY, 1996; MARSHALL et al., 1997; KUNTZE, 2016). As maiores alterações foram evidenciadas nas amostras do Grupo 3 (HC12M), provavelmente devido a maior concentração do HCl, como já relatado em estudo anterior (KUNTZE, 2016).

A maior desmineralização da dentina intertubular permitiu a visualização de estruturas tubulares, ora íntegras, ora fraturadas/deslocadas, cuja análise elemental revelou ter composição semelhante à da dentina adjacente, o que nos leva a deduzir que tais estruturas são remanescentes da dentina peritubular.

Estes resultados se contrapõem aos de outros autores (REYES-CARMONA; FELIPPE; FELIPPE, 2009; DREGER et al., 2012), os quais identificaram estruturas semelhantes como sendo deposição mineral intratubular (tipo *tags*); e reforça a hipótese formulada por Felipe em 2012, de que parte da dentina peritubular exposta pode ser confundida com a formação de apatita carbonatada no interior dos túbulos dentinários. Giachetti; Bertini; Russo (2004) também já haviam atentado para a falha na interpretação dos *tags* quando estudaram a interação resina/adesivo/dentina.

Imagens semelhantes também foram descritas por outros pesquisadores (ISOKAWA; TODA; KUBOTA, 1970; THOMAS & CARELLA, 1983; THOMAS, 1984; BERTASSONI; STANKOSKA; SWAIN, 2012), que sugeriram tratar-se da *lamina limitans*, parte orgânica da dentina peritubular que resiste ao processo de desmineralização. No entanto, como já mencionado, a análise elemental das estruturas visualizadas nesta pesquisa revelou tratar-se de uma estrutura mineral e não orgânica.

A análise em MEV-EDX da camada lisa e homogênea na superfície mais interna da dentina das amostras dos Grupos 2 e 3 revelou elementos químicos compatíveis com a composição da resina empregada no embutimento dos discos. (Fig. 3). É provável que esta camada tenha se formado em decorrência do polimento das amostras. Autores a têm descrito como “intercamada”, resultado do processo de biomineralização após a interação de biomateriais com a dentina (SARKAR et al., 2005; REYES-CARMONA; FELIPPE; FELIPPE, 2009; REYES-CARMONA; FELIPPE; FELIPPE, 2010; DREGER et al., 2012). Vale ressaltar que nos trabalhos acima mencionados, as amostras também foram submetidas ao embutimento em resina e polimento. Interessantemente, no trabalho de Felipe (2012), as amostras não foram submetidas ao embutimento e polimento, e nenhuma intercamada foi visualizada. A ausência desta camada nas

amostras do Grupo 1 pode ser em função da presença do MTA no espaço do canal radicular, o que impediu a penetração da resina.

Os resultados obtidos na presente pesquisa apontam para a necessidade de uma diferenciação mais acurada entre a constituição da dentina remanescente após a desmineralização e de possíveis estruturas formadas a partir da interação da dentina com diferentes materiais restauradores e/ou reparadores.

Conclusões

Foi possível concluir que: o aspecto estrutural da dentina após a desmineralização com HCl 6M e 12M mostrou-se similar, independentemente da interação prévia com MTA/PBS; as alterações estruturais foram mais evidentes nas amostras tratadas com HCl 12M, e a análise em MEV-EDX revelou que a composição das estruturas remanescentes era compatível com a da dentina.

Referências

- BERTASSONI, L.E.; STANKOSKA K.; SWAIN M.V. Insights into the structure and composition of the peritubular dentin organic matrix and the lamina limitans. **Micron**, v.43, n.2-3, p.229–36, 2012.
- CASTANHO G.M. **Estudo comparativo *in vitro* das estruturas inorgânicas e orgânicas da dentina humana e bovina saudável e esclerosada: nanodureza, concentração de Ca e P e análise morfológica**. 2010. F. Tese (Doutorado em Dentística) – Programa de pós-graduação em Odontologia, Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, São Paulo.
- DREGER L.A.S.; FELIPPE W.T.; REYES-CARMONA J.F.; FELIPPE G.S.; BORTOLUZZI E.A.; FELIPPE M.C.S. Mineral trioxide aggregate and Portland cement promote biomineralization *in vivo*. **J Endod**, v.38, n.3, p.324-9, 2012.
- FELIPPE G.S. **Capacidade de promover biomineralização de diferentes bioagregados**. 2012. 32f. Dissertação (Mestrado em Endodontia) – Programa de pós-graduação em Odontologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.
- FERRARI M.; VICHI A.; GRANDINI S. Efficacy of different techniques on bonding to root canal walls: an SEM investigation. **Dent Mater**, n.17, p.422–9, 2001.
- FONSECA R.B.; HAITER-NETO F.; CARLO H.L.; SOARES C.J.; SINHORETI M.A.C.; PUPPIN- RONTANI R.M.; et al. Radiodensity and hardness of enamel and dentin of human and bovine teeth, varying bovine teeth age. **Arch Oral Biol**, v.53, n.11, p.1023-29, 2008.
- GIACHETTI L.; BERTINI F.; RUSSO D.S. Investigation into the nature of dentin resin tags: A scanning electron microscopic morphological analysis of demineralized bonded dentin. **The Journal of Prosthetic Dentistry**, v.92, n.3, p.233-8, 2004.
- GOLDBERG M.; KULKARNI A.B.; YOUNG M.; BOSKEY A. Dentin: Structure, Composition and Mineralization: The role of dentin ECM in dentin formation and mineralization. **Front Biosci (Elite Ed)**, v.1, n.3, p.711-35, 2011.

ISOKAWA S.; TODA Y.; KUBOTA K. A scanning electron microscopic observation of etched human peritubular dentin. **Arch Oral Biol**, v.15, n.12, p.1303–6, 1970.

KATO M.T et al. Activity of matrix metalloproteinases in bovine versus human Dentine. **Caries Res**, v.45, p.429-34, 2011.

KUNTZE M.M. **Avaliação por microscopia eletrônica de varredura da ultraestrutura dentinária após a desmineralização superficial**. 2016. 31f. Dissertação (Mestrado em Endodontia) – Programa de pós-graduação em Odontologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

MARSHALL JR G.W.; M. BALOOCH M.; TENCH R.J.; KINNEY J.H.; MARSHALL S.J. Atomic force microscopy of acid effects on dentin. **Dent Mater**, n.9, p.265-8, 1993.

MARSHALL JR G.W.; MARSHALL S.J.; KINNEY J.H.; BALOOCH M. The dentin substrate: structure and properties related to bonding. **J Dent**, v.25, n.6, p.441–58, 1997.

PASHLEY D.H. Dynamics of the Pulpo-Dentin Complex. **Crit Rev Oral Biol Med**, v.7, n.2, p.104–33, 1996.

PERDIGÃO J.; LAMBRECHTS P.; VAN MEERBEEK B.; TOMÉ A.R.; VANHERLE G.; LOPES A.B. Morphological field emission-SEM study of the effect of six phosphoric acid etching agents on human dentin. **Dent mater**, v.12, n.4, p.262-71, 1996.

REYES-CARMONA J.F.; FELIPPE M.S.; FELIPPE, W.T. Biomineralization ability and interaction of Mineral Trioxide Aggregate and White Portland Cement with dentin in a phosphate-containing fluid. **J Endod**, v.35, n.5, p.731-6, 2009.

REYES-CARMONA J.F.; FELIPPE M.S.; FELIPPE W.T. Ability of Mineral Trioxide Aggregate and Portland Cement on dentin enhances the push-out strength. **J Endod**, v.36, n.2, p.286-91, 2010.

SARKAR N.K. CAICEDO R.; RITWIK P.; MOISEYENA R.; KAWASHIMA I. Physiochemical basis of the biological properties of Mineral Trioxide Aggregate. **J Endod**, v.31, n.2, p.97-100, 2005.

SAURO S. et al. Resin–dentin bonds to EDTA-treated vs. acid-etched dentin using ethanol wet-bonding. **Dent Mater**, v.26, n.4, p.368–79, 2010.

SCHILKE R.; LISSON J.A.; BAUSS O.; GEURTSSEN W. Comparison of the number and diameter of dentinal tubules in human and bovine dentine by scanning electron microscopic investigation. **Arch Oral Biol**, v.45, n.5, p.355-61, 2000.

TAKUMA S. Structure around the dentinal tubule. **J Dent Res**, v.39, n.5, p.973-81, 1970.

TEZVERGIL-MUTLUAY A.; MUTLUAY M.M.; AGEE K.A.; SESEOGULLARI-DIRIHAN R., HOSHIKA T., CADENARO M, et al. Carbodiimidecross-linking inactivates soluble and matrix-bound MMPs, *in vitro*. **J Dent Res**, n.91, p.192–6, 2012.

THOMAS H.F. Lamina Limitans of Human Dentinal Tubules. **J Dent Res**, v.63, n.8, p.1064-6, 1984.

THOMAS H.F.; CARELLA P. A scanning electron microscope study of dentinal tubules from un-erupted human teeth. **Arch. Oral Biol**, n.28, p.1125–30, 1983.

3 REFERÊNCIAS

AHUJA P.; NANDINI S.; BALLAL S.; VELMURUGAN N. Effectiveness of Four Different Final Irrigation Activation Techniques on Smear Layer Removal in Curved Root Canals: A Scanning Electron Microscopy Study. **J Dent**, v.11, n.1, p.1-9, 2014.

BEDRAN-RUSSO A.K.; PEREIRA P.N.; DUARTE W.R.; OKUYAMA K.; YAMAUCHI M. Removal of dentin matrix proteoglycans by trypsin digestion and its effect on dentin bonding. **J. Biomed. Mater Res B App Biomater**, v.85, n.1, p.261–6, 2008.

BERTASSONI L.E.; HABELITZ S.; KINNEY, J.H.; MARSHALL S.J.; MARSHALL J.R. Biomechanical perspective on the remineralization of dentin. **Caries Res**, v.43, p.70–7, 2009.

BERTASSONI L.E.; STANKOSKA K.; SWAIN M.V. Insights into the structure and composition of the peritubular dentin organic matrix and the *lamina limitans*. **Micron**, v.43, n.2-3, p.229–36, 2012.

BOSKEY A.L. The role of extracellular matrix components in dentin mineralization. **Crit Rev Oral Biol Med**, v.2, n.3, p.369–87, 1991.

BYERS M.R. Dental sensory receptors. **Int Rev Neurobiol**, n.25, p.39-44, 1984.

CASTANHO G.M. **Estudo comparativo *in vitro* das estruturas inorgânicas e orgânicas da dentina humana e bovina saudável e esclerosada: nanodureza, concentração de Ca e P e análise morfológica**. 2010. 101p. Tese (Doutorado em Dentística) – Programa de pós-graduação em Odontologia, Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, São Paulo.

DREGER L.A.S.; FELIPPE W.T.; REYES-CARMONA J.F.; FELIPPE G.S.; BORTOLUZZI E.A.; FELIPPE M.C.S. Mineral trioxide aggregate and Portland cement promote biomineralization *in vivo*. **J Endod**, v.38, n.3, p.324-9, 2012.

DRIESENS F.C.M.; VERBEECK R.M. **Biominerals**. Editora: CRC Press: Florida, 1990, p.163-78.

FELIPPE G.S. **Capacidade de promover biomineralização de diferentes bioagregados.** 2012. 32f. Dissertação (Mestrado em Endodontia) – Programa de pós-graduação em Odontologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

FERRARI M.; VICHI A.; GRANDINI S. Efficacy of different techniques on bonding to root canal walls: an SEM investigation. **Dent Mater**, n.17, p.422–9, 2001.

FONSECA R.B.; HAITER-NETO F.; CARLO H.L.; SOARES C.J.; SINHORETI M.A.C.; PUPPIN- RONTANI R.M.; et al. Radiodensity and hardness of enamel and dentin of human and bovine teeth, varying bovine teeth age. **Arch Oral Biol**, v.53, n.11, p.1023-29, 2008.

GIACHETTI L.; BERTINI F.; RUSSO D.S. Investigation into the nature of dentin resin tags: A scanning electron microscopic morphological analysis of demineralized bonded dentin. **J Prosthet Dent**, v.92, n.3, p.233-8, 2004.

GOLDBERG M.; TAKAGI M. Dentine proteoglycans: composition, ultrastructure and functions. **Histochem. J**, v.25, n.11 p.781–806, 1993.

GOLDBERG M.; KULKARNI A.B.; YOUNG M.; BOSKEY A. Dentin: Structure, Composition and Mineralization: The role of dentin ECM in dentin formation and mineralization. **Front Biosci (Elite Ed)**, v.1, n.3, p.711-35, 2011.

GOTLIV B.A.; VEIS A. The Composition of Bovine Peritubular Dentin: Matching TOF-SIMS, Scanning Electron Microscopy and Biochemical Component Distributions. **Cells Tissues Organs**, v.189, n.1-4, p.12–9, 2009.

HABELITZ S.; RODRIGUEZ B.J.; MARSHALL S.J.; MARSHALL G.W.; KALININ S.V.; GRUVERMAN A. Peritubular Dentin Lacks Piezoelectricity. **J Dent Res**, v.86 n.9, p.908–11, 2007.

HASHEMINIA S.M.; REZA B.; FEIZIANFARD M.; NASOURI M. A Comparative Study of the Removal of Smear Layer by Two Endodontic Irrigants and Nd:YAG Laser: A Scanning Electron Microscopic Study. **ISRN Dentistry**, v.2012, p.1–7, 2012.

ISOKAWA S.; TODA Y.; KUBOTA K. A scanning electron microscopic observation of etched human peritubular dentin. **Arch Oral Biol**, v.15, n.12, p.1303–6, 1970.

KATO M.T et al. Activity of matrix metalloproteinases in bovine versus human Dentine. **Caries Res**, v.45, p.429-34, 2011.

KUNTZE M.M. **Avaliação por microscopia eletrônica de varredura da ultraestrutura dentinária após a desmineralização superficial**. 2016. 31f. Dissertação (Mestrado em Endodontia) – Programa de pós-graduação em Odontologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

MARSHALL G.W. Dentin microstructure and characterization. **Quintessence Int**, v.24, n.9, p.606-11, 1993.

MARSHALL JR G.W.; M. BALOOCH M.; TENCH R.J.; KINNEY J.H.; MARSHALL S.J. Atomic force microscopy of acid effects on dentin. **Dent Mater**, n.9, p.265-8, 1993.

MARSHALL JR G.W.; MARSHALL S.J.; KINNEY J.H.; BALOOCH M. The dentin substrate: structure and properties related to bonding. **J Dent**, v.25, n.6, p.441–58, 1997.

MJOR I.A.; FEJERSKOV O. **Histology of the Human Tooth**. 2. ed. Editora: Munksgaard, Copenhagen, 1979.

PASHLEY D.H. Clinical correlations of dentin structure and function. **J Prosthet Dent**, v.66, n.6, p.777-81, 1991.

PASHLEY D.H. Dynamics of the Pulpo-Dentin Complex. **Crit Rev Oral Biol Med**, v.7, n.2, p.104–33, 1996.

PERDIGÃO J.; LAMBRECHTS P.; VAN MEERBEEK B.; TOMÉ A.R.; VANHERLE G.; LOPES A.B. Morphological field emission-SEM study of the effect of six phosphoric acid etching agents on human dentin. **Dent Mater**, v.12, n.4, p.262-71, 1996.

REYES-CARMONA J.F.; FELIPPE M.S.; FELIPPE, W.T. Biomineralization ability and interaction of Mineral Trioxide Aggregate and White Portland Cement with dentin in a phosphate-containing fluid. **J Endod**, v.35, n.5, p.731-6, 2009.

REYES-CARMONA J.F.; FELIPPE M.S.; FELIPPE W.T. Ability of Mineral Trioxide Aggregate and Portland Cement on dentin enhances the push-out strength. **J Endod**, v.36, n.2, p.286-91, 2010.

SARKAR N.K. CAICEDO R.; RITWIK P.; MOISEYENA R.; KAWASHIMA I. Physiochemical basis of the biological properties of Mineral Trioxide Aggregate. **J Endod**, v.31, n.2, p.97-100, 2005.

SAURO S. et al. Resin–dentin bonds to EDTA-treated vs. acid-etched dentin using ethanol wet-bonding. **Dent Mater**, v.26, n.4, p.368–79, 2010.

SCHILKE R.; LISSON J.A.; BAUSS O.; GEURTSSEN W. Comparison of the number and diameter of dentinal tubules in human and bovine dentine by scanning electron microscopic investigation. **Arch Oral Biol**, v.45, n.5, p.355-61, 2000.

TAKUMA S. Structure around the dentinal tubule. **J Dent Res**, v.39, n.5, p.973-81, 1970.

TAY F.R.; PASHLEY D.H.; RUEGGERBERG F.A.; LOUSHINE R.J.; WELLER R.N. Calcium phosphate phase transformation produced by the interaction of the Portland Cement component of White Mineral Trioxide Aggregate with a phosphate-containing fluid. **J Endod**, v.33, n.11, p.1347-51, 2007.

TEN CATE. **Histologia Oral: Desenvolvimento, estrutura e função**. 8. ed. Editora: Elsevier: Rio de Janeiro, 2013, cap.1, p.3.

TEZVERGIL-MUTLUAY A. et al. Carbodiimide cross-linking inactivates soluble and matrix-bound MMPs, *in vitro*. **J Dent Res**, v.91, n.2, p.192–6, 2012.

THOMAS H.F.; CARELLA P. A scanning electron microscope study of dentinal tubules from un-erupted human teeth. **Arch Oral Biol**, n.28, p.1125–30, 1983.

THOMAS H.F. Lamina Limitans of Human Dentinal Tubules. **J Dent Res**, v.63, n.8, p.1064-6, 1984.

XU C.; WANG Y. Chemical composition and structure of peritubular and intertubular human dentine revisited. **Arch Oral Biol**, v.57, n.4, p.383–91, 2012.

4 APÊNDICE A

“ANÁLISE DA INTERFACE BIOAGREGADOS-DENTINA: ESTUDO *IN VIVO*”

Biomaterial-Dentin Interface Evaluation: an *In Vivo* Study

Felippe G.S.; Bosio C.C.; Felippe M.C.S.; Felippe W.T.; Teixeira C.S.; Bortoluzzi E.A.

Abstract

Introduction: Mineral trioxide aggregate (MTA) has been considered a bioactive material because of its ability to produce carbonated apatite. However, there is little information about the bioactivity of new bioaggregates introduced in the market. This study analyzed the interaction of the cements MTA FILLAPEX (MTAF), iRoot SP, DiaRoot Bioaggregate (BA) and MTA Branco (MTAB) with dentin *in vivo*. **Methods:** One hundred and sixty human dentin tubes were randomly divided in 4 experimental and 1 control group (n = 8/group). After filling with the materials, the tubes of experimental groups were implanted subcutaneously in 32 rats at four sites equidistant from the dorsal area. The tubes of control group remained empty and were implanted in a fifth site. After 7, 15, 30 and 90 days the animals were euthanized and the dentin tubes retrieved for SEM/EDX analysis.

Results: The SEM analysis showed that in most of the tubes filled with MTAF, and in a few tubes filled with iRoot and BA, structures resembling mineral deposition on the dentin surface and in the interior of the dentinal tubules were detected. The EDX analysis revealed that the calcium/phosphate ratios from these structures were variable and compatible with that of dentin. Surprisingly, the same structures were detected in the empty tubes (control group). In the MTAB group, no structures could be detected. **Conclusion:** It was concluded that the interaction of the cements with dentin did not lead to a biomineralization process, since the composition of the analysed structures was similar to the subjacent dentin.

Keywords: Bioactivity, bioaggregates, biomineralization, carbonated apatite, mineral trioxide aggregate.

Introduction

Since its introduction in endodontics (1993), mineral trioxide aggregate (MTA) has been widely used in root perforation (1, 2), pulpotomy (3), root-end filling (4), and apical plugs (5) because of its biocompatibility (5,6) and sealing ability (4, 7-9).

The biocompatibility of MTA is related to its bioactivity and ability to induce mineral precipitation when in contact with phosphate-buffered saline (PBS) in a process called biomineralization (10-12). The calcium ions released by MTA interact with the phosphate ions from PBS and precipitate hydroxyapatite, leading to the formation of a layer on the cement surface that chemically adheres to the dentin (10). In contact with PBS, the ProRoot MTA, MTA BIO, MTA Branco and white Portland cements precipitate carbonated apatite, resulting in the formation of a mineralized layer in the dentin-cement interface and mineral precipitation in the interior of dentinal tubules (12). The mineral deposition increases with time (13) and has a positive influence on the push-out bond strength of these cements to the dentin (14).

Studies have also demonstrated that the biomineralization process occurs after the implantation of dentin tubes containing MTA in the subcutaneous tissue of mice (15) and rats (16). Despite their good biological properties, MTA-based cements present some physical properties that impair their use as root canal sealers (17). To maintain its biological properties and improve its physical properties, new cements based on bioceramics (18) were developed: MTA FILLAPEX (Angelus Soluções Odontológicas, PR, Brazil), iRoot SP (Innovative Bioceramix, Vancouver, Canada) and DiaRoot Bioaggregate (DiaDent Group International, BC, Canada).

MTA FILLAPEX (MTAF) is a MTA-based root-canal sealer composed of resin, nanoparticulated silica, MTA, bismuth oxide and pigments. iRoot SP (iRoot) was also developed for root canal filling. Composed of calcium silicate, calcium phosphate, calcium hydroxide and thickener agents, it can be easily applied and does not contain alumina. DiaRoot Bioaggregate (BA) is similar to MTA and is indicated for perforation, root-end filling, apexification, resorption and pulp-capping. BA was the first reparative cement to be developed with nanoparticles (19). It contains calcium, calcium hydroxide, hydroxyapatite, tantalum and silicon oxide.

There is few information about the interaction of these new cements with dentin (20). Therefore, the purpose of this study was to evaluate the occurrence of mineral deposition in the dentin-cement interface after the implantation of dentin tubes filled with MTAf, iRoot, BA and MTA Branco (MTAB) in rat subcutaneous tissue.

Materials and Methods

The research protocol was approved by the Ethics Committee for Research with Human Beings and by the Animal Ethics Screening Committee.

Preparation of Specimens

The crowns and apical thirds from the roots of 160 single-rooted extracted human teeth were removed to obtain 7-mm-length dentin tubes. The space of each root canal was enlarged with Gates-Glidden burs to obtain 1.3-mm-diameter cavities. The dentin tubes were washed with distilled water and autoclaved. Before implantation, they were irrigated with 17% ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) followed by a 1% sodium hypochlorite solution (SH), and dried. The samples were then randomly divided into 4 experimental and one control group (n = 32/group). In the experimental groups, the cavities of each tube were filled with MTAf, iRoot, BA or MTAB. The cements were mixed according to the manufacturer's instructions. The control group tubes remained empty.

Tube Implantation

A total of 32 male Wistar rats (*Rattus norvegicus*), weighing between 250 and 300 g, were used. The animals were anesthetized with 2% xylazine (Anasedan, Sespo Ind. e Com. Ltda, Paulínia, SP, Brasil) and 10% ketamine hydrochloride (Dopalen, Sespo, Brasil). After tricotomy and asepsis, two 2-cm incisions were made in the backs of the rats, and the skin was deflected to create 5 sites. Four dentin tubes, each filled with one of the cements, and one empty tube (control) were implanted, one at each site, following a previously established placement order, with turnover of the materials in the regions. The edges of the incision were properly approximated and sutured. The animals were euthanized after 7, 15, 30 and 90 days (n = 8). Then, the dentin tubes were removed, washed in distilled water and prepared for

scanning electron microscope (SEM) analysis of the dentin-material interface (16).

SEM Analysis

The specimens were mounted on aluminum stubs and sputter-coated with two 300-Å gold layers. They were then observed under a SEM (Philips SEM XL 30; Philips, Eindhoven, Netherlands) at an accelerating voltage of 15 kV. The cement-dentin interface was examined at different magnifications (20-17000x) to evaluate the occurrence of mineral deposition in the dentin-cement interface. When detected, its elemental composition was investigated by energy dispersive x-ray analysis (EDX) with a SEM (Philips SEM XL 30).

Results

In most of the tubes filled with MTAF, structures resembling mineral deposition on the dentin surface and in the interior of the dentinal tubules could be observed (Fig. 1A, 1B, 1C, 1E, 1F). At 7 and 30 days, they were detected in all tubes, and at 15 and 90 days, in 7 of 8 samples. Such structures were also found in a few tubes filled with iRoot (1G) and BA (1H), and, interestingly, in the empty tubes (control group) (1J). The SEM/EDX analysis showed that structures were composed mainly of calcium and phosphorus (Fig. 1D, 2B, 2C) in variable proportions. In contrast, in the MTAB group (Fig. 1I), no structures could be detected. The experimental period had no influence on the structures formation.

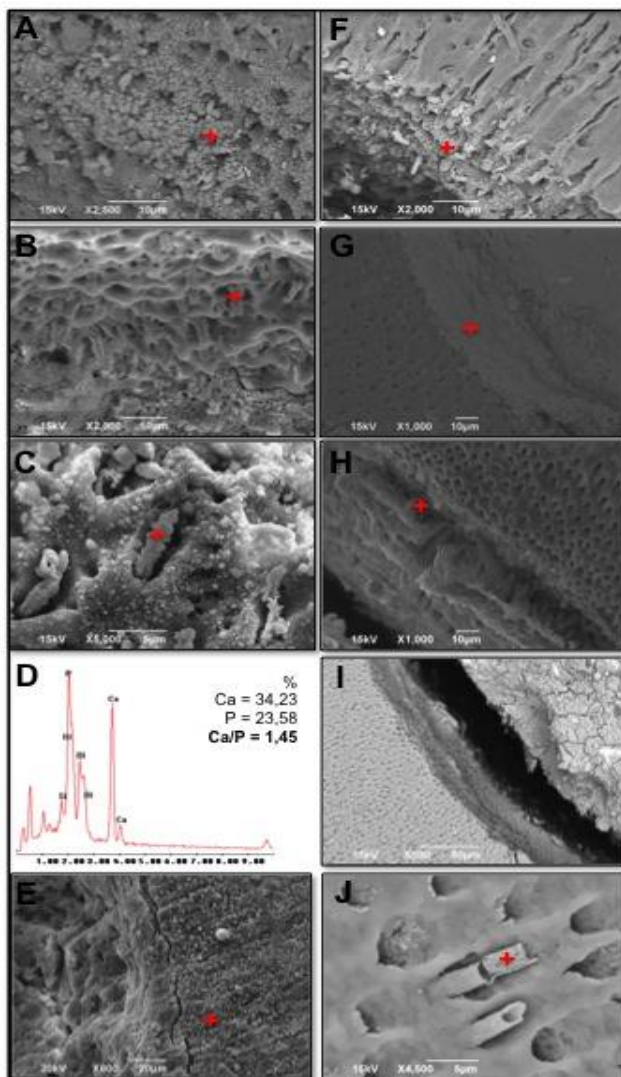


Figure 1. Photomicrographs of the MTAF-dentin interface at 7 (A), 15 (B, C), 30 (E) and 90 (F) days. Structures resembling mineral deposition on the dentin surface and in the interior of the dentinal tubules can be observed (+). (D) EDX spectrum revealing the chemical composition and the Ca/P ratio of the intratubular mineral deposition observed in C. Photomicrographs of the iRoot-dentin (G), BA-dentin (H) and MTAB-dentin (I) interfaces. Photomicrograph of the dentin from an empty tube (J).

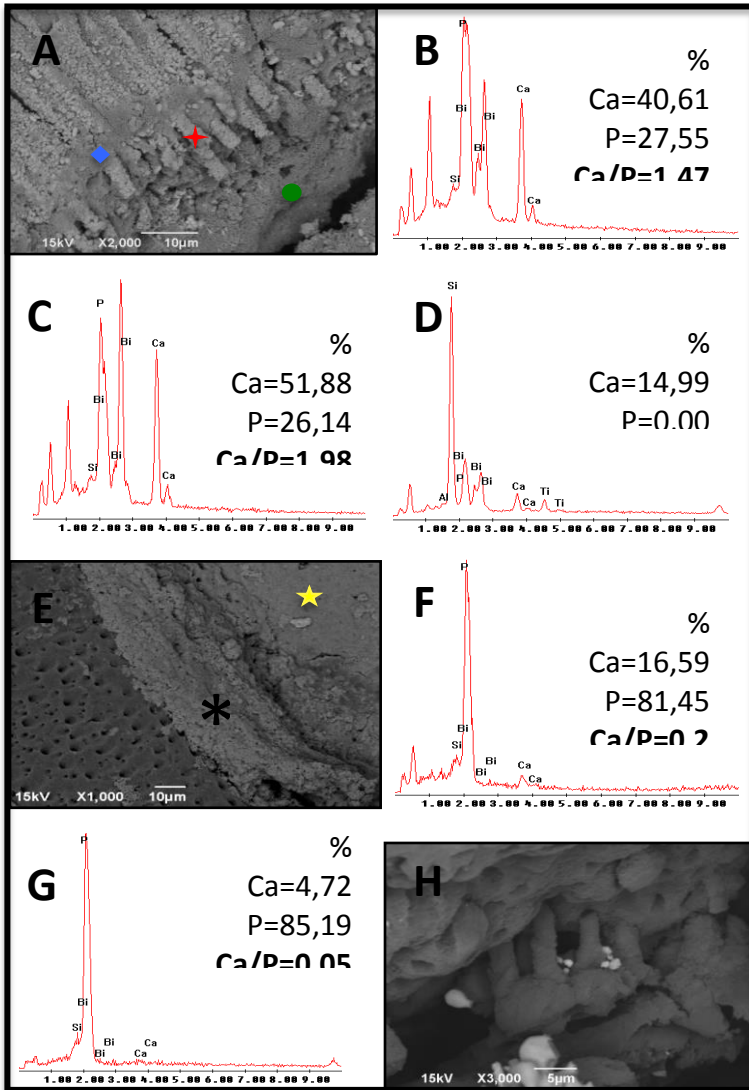


Figure 2. Photomicrographs of the MTAF-dentin (A), iRoot-dentin (E) and BA-dentin interfaces (H) from the 7-day period. EDX spectrum of the marked areas in A: intratubular mineral deposition (★) (B), dentin (◆) (C) and material (●) (D). EDX spectrum of the marked area (★) in E: supposed interfacial layer (F). EDX spectrum of the marked area (★) in E: iRoot (G). Photomicrograph showing BA in the dentinal tubules (H).

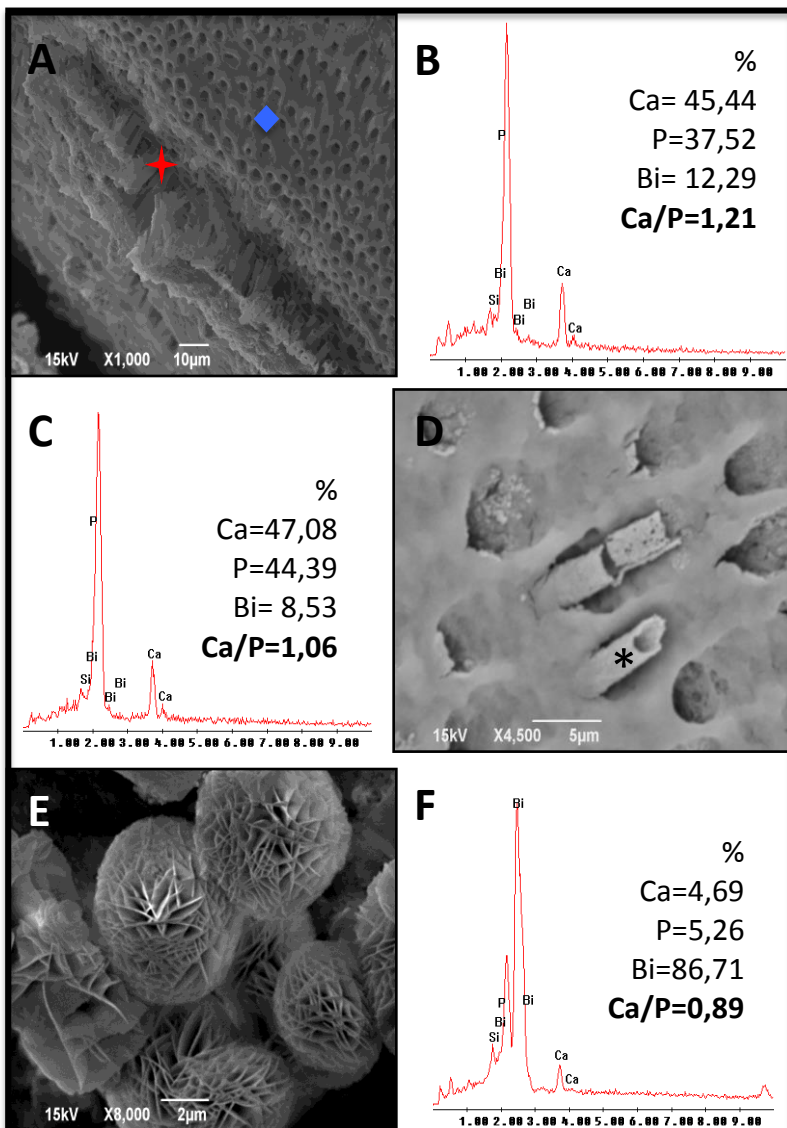


Figure 3. Photomicrograph of BA-dentin interface from the 15-day period (A). EDX spectrum of the marked areas in A: \star (B) and \blacklozenge (dentin) (C). Photomicrograph of the dentin from an empty tube (observe the intratubular mineral deposition-like features (*)) (D). Photomicrograph (E) and EDX spectrum (F) of a crystal observed over the dentin.

Discussion

The methodology used in this study has already been used in previous studies that claimed to evaluate the biomineralization process (Dreger et al., 2012; Reyes-Carmona et al., 2010b).

The results showed differences between the tested materials. In most of the tubes filled with MTAF, and in a few tubes filled with iRoot and BA, structures resembling mineral deposition on the dentin surface and in the interior of the dentinal tubules were detected.

In the dentin-cement interface, some images suggested the formation of a mineral layer, regardless of the group (Figs. 1E, 2E e 2H). However, the EDX analysis showed that this layer had composition similar to the material (Figs. 2F and 2G).

In the interior of the dentinal tubules, the EDX analysis showed that the composition of this supposed mineral deposition was similar to the adjacent dentin (Fig. 3B and 3C). Probably, the acid used for the preparation of the specimens for SEM analysis may have decalcified the intertubular dentin (less calcified), exposing the peritubular dentin (more calcified). We believe that these structures were wrongly interpreted as mineral deposition in the interior of the tubules in previous studies (15, 16). The analysis of the empty tubes (control group) showed the same structures (Fig. 3D), which reinforces this hypothesis.

Structures similar to the apatite crystals described by Tay et al. (2007) and Reyes-Carmona et al. (2009) were observed on dentin surface of some samples of MTAF and MTAB groups (Fig. 3E). However, the EDX analysis showed that these crystals were mainly composed of bismuth (Fig. 3F), suggesting they were transferred from the material to the dentin surface during the polishing.

The EDX analysis revealed the presence of silicon on the dentin adjacent to all materials. This observation was likely due to the capacity of the dentin to absorb this element from the material (Han and Okiji, 2011). In addition, the samples were kept in vials with silica for the dehydration process.

Interestingly, MTAB did not show any sign of mineral deposition (Fig. 1I), in contrast to other *in vivo* studies (Dreger et al., 2012; Reyes-Carmona et al., 2010b). The reason for this difference is being investigated.

Conclusion

It was concluded that the interaction of the cements with dentin did not lead to a biomineralization process, since the composition of the analysed structures was similar to the subjacent dentin.

Acknowledgments

The authors deny any conflicts of interest related to this study.

References

1. Torabinejad M, Chivian N. Clinical applications of mineral trioxide aggregate. *J Endod* 1999;25:197-205.
2. Holland R, Otoboni Filho JA, Souza V, Nery M.J, Bernabé PFE. Mineral trioxide aggregate repair of lateral root perforations. *J Endod* 2001;27:281-4.
3. Menezes R, Bramante CM, Letra A, Carvalho VGG, Garcia RB. Histologic evaluation of pulpotomies in dog using two types of mineral trioxide aggregate and regular and white Portland cements as wound dressings. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2004;98:376-9.
4. Torabinejad M, Rastegar AF, Kettering JD, Pitt Ford TR. Bacterial leakage of mineral trioxide aggregate as a root-end filling material. *J Endod* 1995;21:109-12.
5. Felipe WT, Felipe MCS, Rocha MJC. The effect of mineral trioxide aggregate on the apexification and periapical healing of teeth with incomplete root formation. *Int Endod J* 2006;39:2-9.
6. Camilleri J, Pitt Ford TR. Mineral trioxide aggregate: a review of the constituents and biological properties of the material. *Int Endod J* 2006;39:747-54.
7. Lee SJ, Monsef M, Torabinejad M. Sealing ability of mineral trioxide aggregate for repair of lateral root perforations. *J Endod* 1993;19:541-4.
8. Parirokh M, Torabinejad M. A comprehensive literature review-part I: chemical, physical, and antibacterial properties. *J Endod* 2010;36:16-27.

9. Al-Hezaimi K, Naghshbandi J, Oglesby S, Simon JH, Rotstein I. Human saliva penetration of root canals obturated with two types of mineral trioxide aggregate cements. *J Endod* 2005;31:453–6.
10. Sarkar NK, Caicedo R, Ritwik P, Moiseyena R, Kawashima I. Physiochemical basis of the biologic properties of Mineral Trioxide Aggregate. *J Endod* 2005;31:97-100.
11. Bozeman TB, Lemon RR, Eleazer PD. Elemental analysis of cristal precipitate from gray and white MTA. *J Endod* 2006;32:425-8.
12. Reyes-Carmona JF, Felipe MS, Felipe WT. Biomineralization ability and interaction of mineral trioxide aggregate and Portland cement with dentin in a phosphate-containing fluid. *J Endod* 2009;35:731-6.
13. Gandolfi MG, Taddei P, Tinti A, Prati C. Apatite-forming ability (bioactivity) of ProRoot MTA. *Int Endod J* 2010;43:917-29.
14. Reyes-Carmona JF, Felipe MS, Felipe WT. The biomineralization ability of mineral trioxide aggregate and Portland cement on dentin enhances the push-out strength. *J Endod* 2010;36:286–91.
15. Reyes-Carmona JF, Santos AS, Figueiredo CP, Baggio CH, Felipe MS, Felipe WT, Cordeiro MC. Host-mineral trioxide aggregate inflammatory molecular signaling and biomineralization ability. *J Endod* 2010;36:1347-53.
16. Dreger LAS, Felipe WT, Reyes-Carmona JF, Felipe GS, Bortoluzzi EA, Felipe MCS. Mineral trioxide aggregate and Portland cement promote biomineralization In vivo. *J Endod* 2012;38:324-9.
17. Scarparo RK, Haddad D, Acasigua GSX, Fossati ACM, Fachin EVF, Grecca FS. Mineral Trioxide Aggregate-sealer: analysis of tissue reactions to a new endodontic material. *J Endod* 2010;36:1174-8.
18. Koch KA, Brave DG, Nasseh AA. Bioceramic technology: closing the endo-restorative circle, Part I. *Dent Today* 2010;29:100-5.
19. De-Deus G, Canabarro A, Alves G, Linhares A, Senne MI, Granjeiro JM. Optimal cytocompatibility of a bioceramic nanoparticulate cement in primary human mesenchymal cells. *J Endod* 2009;5:1387-90.

20. Güven EP, Taşlı PN, Yalvac ME, Sofiev N, Kayahan MB, Sahin F. In vitro comparison of induction capacity and biomineralization ability of mineral trioxide aggregate and a bioceramic root canal sealer. *Int Endod J* 2013;46:1173-82.
21. Perdigão J, Van Meerbeek B, Lopes MM, Ambrose WW. The effect of a re-wetting agent on dentin bonding. *Dent Mater* 1999;15:282-95.
22. Hench LL, Bioceramics: From Concept to Clinic. *J Am Ceram* 1991;74:1487-510.
23. Tay FR, Pashley DH, Rueggeberg FA, Loushine RJ, Weller RN. Calcium phosphate phase transformation produced by the interaction of Portland cement component of white mineral trioxide aggregate with a phosphate-containing fluid. *J Endod* 2007;33:1347-51.
24. Martin RL, Monticelli F, Brackett WW, Loushine RJ, Rockman RA, Ferrari M, Pashley DH, Tay FR. Sealing properties of mineral trioxide aggregate orthograde apical plugs and root fillings in an in vitro apexification model. *J Endod* 2007;33:272-5.
25. Pariookh M, Askarifard S, Mansouri S, Haghdoost AA, Raof M, Torabinejad M. Effect of phosphate buffer saline on coronal leakage of mineral trioxide aggregate. *J Oral Sci* 2009;51:187-91.
26. Saboia V de PA, Saito SK, Pimenta LAF. Aspectos micromorfológicos da interface adesiva em função da variação no preparo do espécime. *Pesqui Odontol Bras* 2000;14:340-4.
27. Han L, Okiji T. Uptake of calcium and silicon released from calcium silicate-based endodontic materials into root canal dentine. *Int Endod J* 2011;44:1081-7.