

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

GUSTAVO ADOLFO GONÇALVES RIVERA MOREIRA SANTOS

Avaliação das propriedades mecânicas da
dentina em dentes afetados
por Amelogênese imperfeita e
Dentinogênese imperfeita

Tese apresentada como requisito parcial para
a obtenção do Título de Doutor em Ciências da
Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em
Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Orientadora: Lilian Marly de Paula

Brasília
2014

Dedico este trabalho à minha esposa Thaís,
aos meus pais e meus irmãos,
alicerces fundamentais da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus por ter me concedido mais essa conquista e que sempre está ao meu lado durante os percalços e vitórias.

À Universidade de Brasília por ter proporcionado a minha formação acadêmica e profissional. Meu eterno respeito à escola e aos mestres que tive a felicidade de conhecer.

À minha esposa Thaís, amor da minha vida. Conhecer você me fez e faz querer ser uma pessoa melhor. Seu apoio, sua palavra amiga, sua preocupação comigo, tudo isso é muito mais do que eu poderia pensar em desejar. Você é o anjo que Deus me deu e, desde de então, tornou meus dias mais iluminados. Muito obrigado por estar ao meu lado nas dificuldades enfrentadas, porque estar junto na felicidade é coisa para qualquer um. Espero poder ser um pouco para você o muito que é para mim. Amo você.

Aos meus pais, Maria Emília e Ubiratan, exemplos para a minha vida. Obrigado por existirem. Obrigado por sempre me apoiarem. Obrigado por me incentivarem principalmente nos momentos de desânimo. Devo a vocês a minha vida e espero sempre lhes orgulhar. Amo vocês.

Aos meus irmãos Fernanda e Marcelo, por estarem sempre comigo nessa jornada. Amo vocês, amo nosso companheirismo, amo nossas conversas e amei poder sempre contar com vocês em todos os momentos que precisei.

Aos meus cunhados Antônio Augusto e Amanda, por serem essas pessoas tão queridas, tão especiais e tão do bem que vocês são. Muito obrigado por estarem sempre presentes.

Ao meu sobrinho Guto que veio alegrar nossas vidas e, em tão pouco tempo, foi capaz de nos fazer uma família ainda mais unida.

À minha orientadora Lilian Marly de Paula, meu eterno agradecimento. Muito obrigado por me abrir as portas, por ser fundamental na minha filosofia de trabalho e por me conhecer. Sim, por me conhecer, agradeço todos os conselhos e as exigências. Obrigado por acreditar em mim. Todos os seus ensinamentos estarão indelevelmente marcados na minha carreira. MUITO OBRIGADO!

Ao professor José Alexander Araújo, por todos os seus enriquecedores ensinamentos e por toda a sua disponibilidade em me auxiliar. A visão do ponto de vista da engenharia na Ciência dos Materiais mudou a minha forma de enxergar a Odontologia. A sua objetividade e inteligência são admiráveis e tenho muito orgulho por ter trabalhado com o senhor.

À professora Ana Carolina Acevedo, por sua amizade, companheirismo e todo o apoio durante o decorrer do projeto. Fico muito feliz por ter tido o privilégio de termos trabalhado juntos e espero que continuemos.

À professora Patrícia Nóbrega Pereira, pela generosidade sempre demonstrada e pelo apoio na etapa de microscopia eletrônica. Muito obrigado também pelas dicas, conselhos e orientações proferidas na qualificação deste trabalho para que fosse possível melhorá-lo.

À professora Fernanda Cristina Pimentel Garcia, pela amizade e pelas orientações dadas na qualificação deste trabalho. É muito bom contar com a ajuda de professores tão competentes como você para a execução de um trabalho.

Aos professores An Tien Li, Paulo Márcio Yamaguti e Haroldo Akeshigue Habe, por todo o apoio em muitas etapas da realização deste trabalho, pelos incontáveis dias em que escutaram minhas lamúrias e por serem os amigos-irmãos que são.

À professora Raquel Lana Passos, por sua amizade e pelo apoio dado em muitas etapas deste trabalho. Muito obrigado pela parceria nesta linha de pesquisa e pelo incentivo constante.

Aos meus sogros, Winter Andrade Coêlho e Patrícia Gonzalez, e cunhados, Victor Gonzalez e Vinícius Gonzalez, pela torcida e apoio para que esta etapa da minha carreira fosse cumprida com êxito.

Aos professores Daniel Rey de Carvalho, Eric Franco Jacomino, Thiago Calabraro Menegazzi, Andréia de Aquino Marsiglio, Ana Paula Pedreira, Alexandre Franco Miranda, Taia Maria Rezende, Marcos Porto Arruda, Evelyn Mikaela Kogawa, Luciana de Freitas Bezerra, por compartilharem do sentimento de empolgação com a docência e por serem incentivadores para que eu continuasse firme nesta empreitada.

Aos técnicos de laboratório Maria da Glória e Alexandre Gonçalves da Faculdade de Ciência da Saúde, pela disponibilidade e auxílio prestativo sempre que precisei das suas contribuições.

Aos técnicos Wesley e Edson Lucas de Almeida da Faculdade de Tecnologia, por serem disponíveis e atenciosos na utilização dos equipamentos dos laboratórios e me ajudarem a operá-los.

À professora Ana Tereza por toda a ajuda na etapa de análise estatística deste trabalho.

À Universidade Católica de Brasília, por todo o apoio dado para que eu concluísse mais esta importante etapa da minha carreira.

Aos meus amigos-parceiros, Rodrigo Rodrigues Senra Sacramento, Luiz Gaspar Ribas Mariz e Guilherme Soares de Castro por estarem sempre presentes nos muitos momentos em que eu necessitava espalhar. Vocês são os irmãos que escolhi e sempre me ajudam quando preciso. Muito obrigado.

Ao laboratório de Ensaio dos materiais da Faculdade de Tecnologia da UnB, pela disponibilidade na utilização dos equipamentos de ensaios mecânicos.

Ao laboratório de microscopia eletrônica do Instituto de Ciências Biológicas da UnB, pela disponibilidade na utilização do microscópio eletrônico de varredura.

Aos pacientes do HUB que doaram seus dentes e permitiram a utilização das informações de seus prontuários para o estudo.

"Quando o homem compreende a sua realidade, pode levantar hipóteses sobre o desafio dessa realidade e procurar soluções. Assim, pode transformá-la e o seu trabalho pode criar um mundo próprio, seu Eu e as suas circunstâncias."

Paulo Freire

Resumo

O conhecimento acerca das propriedades mecânicas dos tecidos dentários afetados pelas condições hereditárias de Amelogênese Imperfeita (AI) e Dentinogênese Imperfeita (DGI) é escasso. O presente estudo teve como objetivo avaliar a resistência máxima à tração (RMT) e à compressão (RMC) do tecido dentinário de dentes afetados DGI tipo II e dentes com hipótese diagnóstica de AI hipomaturada. A realização de ensaios mecânicos necessita de criteriosa confecção de espécimes, de um maquinário específico e de uma cuidadosa execução. Para o experimento, foi desenvolvido um dispositivo de testes que tem por objetivo minimizar os viéses relacionados à execução dos ensaios de RMT e RMC. A validação do dispositivo foi feita mediante um estudo de análise da resistência adesiva à microtração, em dentes hígidos, comparando-o a um dispositivo de testes já consagrado. Os dados obtidos no estudo de validação do dispositivo foram avaliados pela Análise de Variância Fatorial, seguido do testes de acompanhamento de Fisher (*Least Square Difference*). Foi verificada a homogeneidade das freqüências dos tipos de fraturas dos espécimes por meio do teste de Qui Quadrado para Independência. O novo dispositivo, Flextest, demonstrou desempenho em ensaios de resistência adesiva à microtração similar a um dispositivo consagrado. A avaliação das propriedades mecânicas foi realizada em espécimes provindos de dentes terceiros molares de pacientes afetados por DGI Tipo II (n=6) e de pacientes com hipótese diagnóstica de AI do tipo hipomaturado e hipoplásico (n=5), tendo como controle terceiros molares de pacientes não-afetados (n=6). Em virtude da dificuldade de obtenção de dentes afetados por DGI-II ou AI, cada dente foi seccionado de forma a serem obtidos espécimes para os ensaios de RMT, RMC e avaliação em microscopia eletrônica de varredura. Os resultados dos ensaios de RMT e RMC foram avaliados tanto intra-grupo quanto inter-grupo e as comparações foram realizadas por meio de testes paramétricos. O mesmo padrão médio de RMT foi observado nos grupos controle e DGI-II, mas não no grupo AI para a

avaliação intra-grupo. A avaliação inter-grupo revelou maior resistência do grupo controle ($95,74 \pm 16,72$) em comparação ao grupo AI ($84,07 \pm 14,13$). O mesmo foi verificado entre o grupo controle e o grupo DGI-II ($67,71 \pm 16,03$), $p < 0,05$. Já na avaliação da RMC intra-grupo, os dentes foram semelhantes entre si em cada um dos grupos analisados. A avaliação inter-grupo em ensaios compressivos verificou que os dentes do grupo controle e do grupo AI apresentaram médias equivalentes entre si ($221,28 \pm 48,69$ e $210,03 \pm 31,57$, respectivamente), $p > 0,05$, porém as médias do grupo controle foram significativamente menores do que aquelas do grupo DGI-II ($254,01 \pm 48,50$), $p < 0,05$. A dentina dos dentes do grupo AI apresentou menor RMT, mas semelhante RMC quando comparada com a dentina dos dentes do grupo controle. A dentina de dentes afetados por DGI-II apresentou maior RMC e menor RMT que a dentina dos dentes dos grupos controle. Alterações estruturais foram observadas somente na dentina afetada pela condição de DGI-II.

Palavras-chave: dentinogênese imperfeita; amelogênese imperfeita; propriedades mecânicas da dentina; resistência máxima à compressão; resistência máxima à tração.

Abstract

The knowledge of the mechanical properties of dental tissues affected by hereditary conditions as Amelogenesis imperfecta (AI) and Dentinogenesis imperfecta (DGI) is scarce. The present study aimed to evaluate the ultimate tensile strength (UTS) and the ultimate compressive strength (UCS) of the dentin of teeth affected DGI type II and teeth with a diagnosis of hypomaturation AI type. The mechanical testing requires careful preparation of the specimens, a specific machinery and careful testing execution. For the experiment, it was developed a testing device which aims to minimize biases related to the execution of microtensile tests and compression. The validation of the device was taken through a study that analyzed the microtensile dentin bond strength in sound teeth, comparing it to an effective testing device. The data obtained in the validation study of the device were evaluated by factorial analysis of variance, followed by Fisher's follow-up tests (Least Square Difference). The homogeneity of frequencies of the types of fractures of the specimens were found by using the Chi Square test for Independence. The new device, Flexitest showed similar performance in microtensile tests to the bencor Multi-T device. The evaluation of the mechanical properties was performed on specimens obtained from third molar teeth of patients affected by DGI type II (n=6) and from patients with a diagnosis of hypomaturation AI type (n=5). Because of the difficulty of getting teeth affected by DGI-II or AI, each tooth was sectioned in order to be obtained specimens for microtensile tests, compression tests and scanning electron microscopy evaluation. The results of UTS and UCS tests in intra-group and inter-group were evaluated and comparisons were performed using parametric tests. The same average UTS pattern was observed in the control group and DGI-II, but not in the AI group for assessing intra-group. The inter-group assessment showed a higher resistance in the control group (95,74±16,72), compared to the AI group (84,07±14,13). The same pattern was observed between the control group and the DGI-II group (67,71±16,03) for $p < 0,05$. The evaluation of intra-group UCS tests revealed that the teeth were similar in each of the analyzed groups, $p > 0,05$. The inter-group assessment in

UCS tests found that the teeth of the control group and AI group showed similar averages ($221,28 \pm 48,69$ and $210,03 \pm 31,57$, respectively), $p > 0,05$, but the control group means were significantly lower than those of the DGI- II group ($254,01 \pm 48,50$), $p < 0,05$. The dentin of teeth affected by AI condition showed a lower UTS, but similar UCS to dentin of the control group. The dentin affected by DGI-II teeth presented higher UCS and lower UTS than the dentin of control group. Structural alterations were observed only in dentin affected by the condition of DGI-II in scanning electron microscopy.

Key-words: dentinogenesis imperfecta; amelogenesis imperfecta; mechanical properties of dentin; ultimate tensile strength; ultimate compressive strength.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Máquina de ensaios MTS com o dispositivo Flextest e célula de carga acoplados para realização dos ensaios de resistência adesiva à microtração	50
Figura 2 - Dispositivo desenvolvido para ensaios de RMT e RMC.....	51
Figura 3 - Bases alinhadas e com entalhe central para fixação dos espécimes.....	52
Figura 4 – Placas metálicas para auxílio de fixação dos espécimes.....	52
Figura 5 – Dispositivos de testes montados na máquina de ensaios MTS. A –Dispositivo Flextest montado na MTS. B – Dispositivo Bencor Multi-T montado na MTS.....	53
Figura 6 - Delineamento de parcelas subdivididas.....	55
Figura 7 – Médias e intervalos de confiança (1,96*EPM) de resistência adesiva à microtração, em MPa, dos dentes submetidos aos dispositivos Bencor Multi-T e Flextest..	58
Figura 8 – Médias, erros padrão e intervalos de confiança (1,96*EPM) de resistência adesiva à microtração, em MPa, dos grupos de dentes submetidos aos dispositivos Bencor Multi-T e Flextest.....	59
Figura 9 – % de espécimes de acordo com os diferentes tipos de fratura entre os dispositivos Flextest e Bencor Multi-T.....	59
Figura 10 – Aparato de latão para fixação dos dentes à mesa auxiliar da máquina de cortes.....	69
Figura 11 – Localização espacial das regiões dentárias que forneceram espécimes para os ensaios de RMT (1D – distal, 1L – lingual, 1V – vestibular), maior comprimento e de região periférica, e RMC (2), menor comprimento e área mais central. Fatia utilizada para análise em microscopia eletrônica de varredura (3).....	71
Figura 12 – Espécimes de maior comprimento foram destinados aos ensaios de RMT e os de menor comprimento aos ensaios de RMC.....	72
Figura 13 – Espécime preparado para o ensaio de RMT colado ao dispositivo.....	73
Figura 14 – Espécime posicionado para o ensaio de RMC apoiado sobre a base acoplada à mesa fixa do dispositivo. Ilustração representativa da orientação dos túbulos dentinários dos espécimes submetidos aos ensaios de RMC.....	74
Figura 15 - 1A e 2A Radiografias panorâmicas da paciente doadora dos dentes 1,2 e 3 nos anos de 2005 e 2011, respectivamente. 3A Fotografia frontal da paciente 1 no ano de 2013 durante consulta de controle preventivo. 1B e 2B Radiografias panorâmicas da paciente doadora dos dentes 4 e 5 nos anos de 2005 e 2011, respectivamente. 3B Fotografia frontal da paciente 2 no ano de 2013 durante consulta de controle preventivo (Grupo A1).....	80
Figura 16 – Comparação intra-grupo das médias e intervalos de confiança da RMT, em MPa, dos espécimes dos dentes dos grupos A) Controle e B) Amelogênese imperfeita (A1).....	81

Figura 17 – Comparação inter-grupo das médias e intervalos de confiança da RMT, em MPa, dos dentes dos grupos controle e amelogênese imperfeita (AI).....	82
Figura 18 – Comparação intra-grupo das médias e intervalos de confiança da RMT, em MPa, relacionada às faces a partir das quais foram obtidos os espécimes dos grupos A) controle e B) amelogênese imperfeita - AI.....	83
Figura 19 – Comparação intra-grupo das médias e intervalos de confiança da RMC, em MPa, dos espécimes dos dentes dos grupos A) controle e B) amelogênese imperfeita (AI).....	85
Figura 20 – Comparação inter-grupo das médias e intervalos de confiança da RMC, em MPa, dos dentes dos grupos controle e amelogênese imperfeita (AI).....	86
Figura 21 - 1A, 2A, 3A Dentina de dente com hipótese diagnóstica de AI do tipo hipomaturado e hipoplásico em aumentos de 1.000x, 2.500x e 5.000x, respectivamente. 1B, 2B, 3B Dentina de dente não-afetado, controle, em aumentos de 1.000x, 2.500x e 5.000x, respectivamente.....	87
Figura 22 - 1A, 2A e 3A Radiografias panorâmicas da paciente doadora dos dentes 1, 2 e 3 nos anos de 2003, 2005 e 2011, respectivamente. 4A Fotografia frontal da paciente 1 no ano de 2013 durante consulta de controle preventivo. 1B, 2B e 3B Radiografias panorâmicas da paciente doadora dos dentes 4, 5 e 6 nos anos de 2003, 2006 e 2011, respectivamente. 4B Fotografia frontal da paciente 2 no ano de 2013 durante consulta de controle preventivo (Grupo DGI).....	89
Figura 23 – Comparação intra-grupo das médias e intervalos de confiança da RMT, em MPa, dos espécimes dos dentes dos grupos A) Controle e B) Dentinogênese imperfeita (DGI).....	90
Figura 24 – Comparação inter-grupo das médias e intervalos de confiança da RMT, em MPa, dos dentes dos grupos controle e dentinogênese imperfeita (DGI).....	91
Figura 25 – Comparação intra-grupo das médias e intervalos de confiança da RMT, em MPa, relacionada às faces a partir das quais foram obtidos os espécimes dos grupos controle e dentinogênese imperfeita (DGI).....	92
Figura 26 – Comparação intra-grupo das médias e intervalos de confiança da RMC, em MPa, dos espécimes dos dentes dos grupos A) controle e B) dentinogênese imperfeita (DGI).....	94
Figura 27 – Comparação inter-grupo das médias e intervalos de confiança da RMC dos dentes dos grupos controle e dentinogênese imperfeita (DGI).....	94
Figura 28 - 1A Dentina de dente afetado por DGI-II em aumento de 1.000x no qual verifica-se a presença de área atubular(*) e áreas com concentração de túbulos com diferentes diâmetros (**). 2A aumento de 2.500x da área (**)......	95
Figura 29 – Curva do comportamento dos espécimes de dentina no ensaio de RMT. O ponto “X” separa a região menor de linearidade entre carga e deslocamento da região	

maior de não-linearidade entre estas grandezas até o momento de ruptura do espécime.....	96
Figura 30 – Curva do comportamento dos espécimes de dentina no ensaio de RMC.....	97

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Sistema adesivo utilizado no estudo e técnica de aplicação de acordo com as normas do fabricante.....	48
Tabela 2 – Comparações intra-grupo: Médias e Desvios padrão de resistência adesiva à microtração entre os dentes submetidos aos dispositivos Bencor Multi-T e Flexitest.....	57
Tabela 3 – Comparações inter-grupo: Médias e Desvios padrão de resistência adesiva à microtração, em MPa, dos grupos de dentes submetidos aos dispositivos Bencor Multi-T e Flexitest.....	58
Tabela 4 - Estatísticas descritivas (n, média e desvio padrão) e intervalos de confiança da RMT, em MPa, dos dentes dos grupos controle e amelogênese imperfeita (AI). P-valor do teste de Análise da Variância (ANOVA) em avaliação intra-grupo*.....	81
Tabela 5 – Estatísticas descritivas (n, média e desvio padrão) e intervalos de confiança da RMT, em MPa, dos dentes dos grupos controle e amelogênese imperfeita (AI). P-valor do teste t para amostras independentes para avaliação inter-grupo*.....	82
Tabela 6 – Estatísticas descritivas (n, média e desvio padrão) e intervalos de confiança da RMT, em MPa, relacionada às faces dentárias a partir das quais foram obtidos os espécimes dos dentes dos grupos controle e amelogênese imperfeita (AI). P-valor do teste de Análise da Variância (ANOVA) em avaliação intra-grupo*.....	83
Tabela 7 – Estatísticas descritivas (n, média e desvio padrão) e intervalos de confiança da RMT, em MPa, relacionada às faces dentárias a partir das quais foram obtidos os espécimes dos dentes dos grupos controle e amelogênese imperfeita (AI). P-valor do teste t para amostras independentes para avaliação inter-grupo*.....	84
Tabela 8 – Estatísticas descritivas (n, média e desvio padrão) e intervalos de confiança da RMC, em MPa, dos dentes dos grupos controle e amelogênese imperfeita (AI). P-valor do teste de Análise da Variância (ANOVA) em avaliação intra-grupo*.....	85
Tabela 9 – Estatísticas descritivas (n, média e desvio padrão) e intervalos de confiança da RMC, em MPa, dos dentes dos grupos controle e amelogênese imperfeita (AI). P-valor do teste de t para amostras independentes em avaliação inter-grupo*.....	85
Tabela 10 – Estatísticas descritivas (n, média e desvio padrão) e intervalos de confiança da RMT, em MPa, dos dentes dos grupos controle e dentinogênese imperfeita (DGI). P-valor do teste de Análise da Variância (ANOVA) em avaliação intra-grupo*.....	90
Tabela 11 – Estatísticas descritivas (n, média e desvio padrão) e intervalos de confiança da RMT, em MPa, dos dentes dos grupos controle e dentinogênese imperfeita (DGI). P-valor do teste t para amostras independentes em avaliação inter-grupo*.....	91
Tabela 12 – Estatísticas descritivas (n, média e desvio padrão) e intervalos de confiança da RMT, em MPa, relacionada às faces dentárias a partir das quais foram obtidos os espécimes	

dos dentes dos grupos controle e dentinogênese imperfeita (DGI). P-valor do teste de Análise da Variância (ANOVA) em avaliação intra-grupo*.....	92
Tabela 13 – Estatísticas descritivas (n, média e desvio padrão) e intervalos de confiança da RMT, em MPa, relacionada às faces dentárias a partir das quais foram obtidos os espécimes dos dentes dos grupos controle e dentinogênese imperfeita (DGI). P-valor do teste t para amostras independentes em avaliação inter-grupo*.....	92
Tabela 14 – Estatísticas descritivas (n, média e desvio padrão) e intervalos de confiança da RMC, em MPa, dos dentes dos grupos controle e dentinogênese imperfeita (DGI). P-valor do teste de Análise da Variância (ANOVA) em avaliação intra-grupo*.....	93
Tabela 15 – Estatísticas descritivas (n, média e desvio padrão) e intervalos de confiança da RMC, em MPa, dos dentes dos grupos controle e dentinogênese imperfeita (DGI). P-valor do teste de t para amostras independentes em avaliação inter-grupo*.....	94

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

- A** – Área
- AI** – Amelogênese Imperfeita
- BSP** – Sialoproteína do osso
- Ca⁺²** – Cálcio
- CONEP** – Comitê Nacional de Ética em Pesquisa
- DF** – Distrito Federal
- DGI** – Dentinogênese Imperfeita
- DGI-II** – Dentinogênese imperfeita Tipo II
- DMP-1** – Proteína da matriz dentinária 1
- DPP** – Fosfoproteína da dentina
- DSP** – Sialoproteína da dentina
- DSPP** – Sialofosfoproteína da dentina
- Fig.** - Figura
- FS** – Faculdade de Ciências da Saúde
- GAGs** – Glicosaminoglinanas
- GPa** - Gigapascal
- HUB** – Hospital Universitário de Brasília
- IC** – Intervalo de confiança
- JDA** – Junção amelodentinária
- KN** – Kilonewton
- MEPE** – Proteína fosforilada da matriz extracelular
- MEV** – Microscopia eletrônica de varredura
- Mg** - Magnésio
- mm²** - Milímetro quadrado
- µm** – micrômetro
- MPa** – Megapascal
- MTS** – Material Test System

n – número de amostras

nm – nanômetro

N – Newton

OH – Grupo hidroxila

OI – Osteogênese Imperfeita

OPN – Osteopontina

P – Forças axiais

PGs – Proteoglicanas

PO₄ – Fosfato

RER – Retículo endoplasmático rugoso

RMT – Resistência máxima à tração

RMC – Resistência máxima à compressão

UCS – Ultimate compressive strength

UnB – Universidade de Brasília

UTS – Ultimate tensile strength

SUMÁRIO

1. Revisão de literatura.....	21
1.1 Odontogênese.....	22
1.2 Amelogênese.....	23
1.2.1 Fases de pré-secreção, secreção e maturação do esmalte.....	24
1.2.2 Composição do esmalte.....	25
1.2.3 Amelogênese imperfeita.....	26
1.3 Dentinogênese.....	29
1.3.1 Composição da dentina.....	31
1.3.2 Dentinogênese imperfeita.....	33
1.4 Propriedades mecânicas dos tecidos dentários.....	35
1.4.1 Tração.....	35
1.4.2 Compressão.....	36
1.4.3 Propriedades mecânicas da dentina.....	37
1.4.4 Propriedades mecânicas da dentina em dentes afetados por AI e DGI.....	41
2. Objetivos – PARTE 1.....	44
2.1 Objetivo geral.....	45
2.2 Objetivo específico.....	45
3. Metodologia – PARTE 1.....	46
3.1 Amostra.....	47
3.1.1 Seleção da amostra.....	47
3.1.2 Preparo da amostra.....	47
3.2 Equipamentos.....	48
3.3 Ensaio para validação do dispositivo.....	53
3.4 Análise estatística.....	54
4.Resultados – PARTE 1.....	56
5. Discussão – PARTE 1.....	60
6. Objetivos – PARTE 2.....	65
6.1 Objetivo geral.....	66
6.2 Objetivos específicos.....	66
7. Metodologia – PARTE 2.....	67
7.1 Amostra.....	68
7.1.1 Seleção da amostra.....	68
7.1.2 Preparo da amostra.....	69
7.2 Equipamentos.....	72
7.3 Ensaio de resistência máxima à tração.....	73
7.4 Ensaio de resistência máxima à compressão.....	74
7.5 Análise estatística.....	75
7.6 Etapa histológica.....	76

7.6.1 Preparo dos espécimes para microscopia eletrônica de varredura.....	76
7.6.2 Análise histológica.....	76
8. Resultados – PARTE 2.....	78
8.1 Grupo Amelogênese imperfeita.....	79
8.1.1 Caracterização fenotípica.....	79
8.1.2 Resistência máxima à tração.....	80
8.1.3 Resistência máxima à compressão.....	84
8.1.4 Análise microestrutural.....	86
8.2 Grupo Dentinogênese imperfeita.....	87
8.2.1 Caracterização fenotípica.....	87
8.2.2 Resistência máxima à tração.....	89
8.2.3 Resistência máxima à compressão.....	93
8.2.4 Análise microestrutural.....	95
8.3 Padrão de curva obtido nos ensaios de resistência máxima à tração e resistência máxima à compressão.....	95
9. Discussão – PARTE 2.....	98
9.1 Amelogênese imperfeita.....	99
9.2 Dentinogênese imperfeita.....	103
10. Conclusões.....	107
11. Referências bibliográficas.....	109
Anexo 1.....	123
Anexo 2.....	124

Revisão de literatura

1. Revisão de literatura

A função mastigatória é responsável pela fase inicial do processo digestivo. A trituração dos alimentos, realizada pelos dentes, é responsável por reduzi-los em pedaços menores capazes de sofrer uma ação mais efetiva das enzimas digestivas. As particularidades da anatomia dentária, o arranjo oclusal entre dentes superiores e inferiores, bem como o resultado funcional desta relação interdentária sempre despertaram a curiosidade. Tão importante quanto entender estes aspectos, seria elucidar as dúvidas relacionadas à capacidade de resistência que os dentes apresentam às demandas funcionais. Em virtude disso, as propriedades mecânicas dos tecidos mineralizados dentários são avaliadas há décadas. O entendimento da formação dentária e alterações nesse processo são importantes para a melhor compreensão das propriedades mecânicas dos dentes não-afetados ou afetados por distúrbios sistêmicos ou condições genéticas.

1.1 Odontogênese

A odontogênese compreende o complexo processo de formação do órgão dentário, sendo possível graças às interações seqüenciais e recíprocas entre o epitélio oral e o ectomesênquima, derivado de células da crista neural (1-3). Inicialmente ocorre uma proliferação das células epiteliais no ectomesênquima adjacente e esse cordão epitelial se divide em uma lâmina vestibular, que formará os futuros arcos dentários e sulco vestibular, e uma lâmina dentária, responsável pelo início da histomorfogênese dentária (1,2,4). A partir da formação da lâmina dentária, as células envolvidas iniciam atividades mitóticas diferenciadas e, sequencialmente, quatro fases deste processo podem ser distinguidas: botão, capuz, campânula e campânula tardia.

Uma alta atividade de proliferação das células epiteliais ocorre de maneira uniforme e regulada na fase de botão. Além disso, existe uma condensação celular do ectomesênquima nesta fase.

A fase de capuz ainda apresenta alta taxa de proliferação das células epiteliais e esta porção epitelial é identificada como órgão do esmalte, formado pelos epitélios externo e interno, separados pelo retículo estrelado, o qual constitui-se numa substância fundamental rica em proteoglicanas. O ectomesênquima, por sua vez, apresenta as células condensadas e justapostas ao epitélio interno do órgão do esmalte, formando uma estrutura chamada de papilla dentária, responsável pelo desenvolvimento do complexo dentino-pulpar. Ademais, células ectomesenquimais formam o folículo dentário, outra estrutura que envolve tanto o órgão do esmalte quanto a papilla dentária e que se encarregará da formação e desenvolvimento do cimento, ligamento periodontal e osso alveolar (5,6).

A proliferação celular diminui na fase de campânula e o término da atividade mitótica em algumas das células inicia a formação de algumas dobras no epitélio interno do órgão do esmalte que determinam o formato da futura coroa dentária. As células da camada mais externa da papilla dentária se diferenciam em odontoblastos e células do epitélio interno do órgão do esmalte se diferenciam em ameloblastos. Odontoblastos e ameloblastos iniciam a secreção da matriz orgânica tanto da dentina quanto do esmalte, respectivamente (5).

A fase de campânula tardia é caracterizada pela deposição de esmalte, dentina e conseqüente estabelecimento da junção amelodentinária (JAD), culminando na formação da coroa dentária (4,5,7).

1.2 Amelogênese

O processo de formação do esmalte é denominado amelogênese e as células responsáveis são os ameloblastos, células pós-mitóticas altamente polarizadas (4). O desenvolvimento do esmalte é classificado em três fases morfológicamente distintas: pré-secreção, secreção e maturação (8).

1.2.1 Fases de pré-secreção, secreção e maturação do esmalte

Ao final da fase de campânula, as células do epitélio interno do órgão do esmalte passam por algumas alterações citológicas como: polarização citoplasmática, inversão de polaridade com orientação nuclear voltada para a região do estrato intermediário e organelas deslocadas em direção à papila dentária. Esse processo de diferenciação celular reflete-se também num maior desenvolvimento do retículo endoplasmático rugoso (RER) e do complexo de Golgi, aspectos celulares relacionados com características de células secretoras. Essas células, chamadas pré-ameloblastos, secretam uma pequena quantidade de proteínas que atuam como sinalizadoras na papilla dentária para a completa diferenciação dos odontoblastos (9). Os odontoblastos recém-diferenciados secretam a dentina do manto e expressam transitoriamente algumas proteínas que agem como sinalizadoras para a diferenciação completa dos ameloblastos (4,10).

Os ameloblastos diferenciados secretam proteínas em sua porção apical diretamente sobre a região que virá a se tornar a JAD (8,11). À medida que os ameloblastos secretam a matriz orgânica, uma migração centrífuga ocorre, distanciando estas células do contato com o tecido dentinário recém-depositado pelos odontoblastos. A mineralização da matriz recém-secretada ocorre em aproximadamente 30% do seu volume e cristais de hidroxiapatita podem ser identificados $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH_2)]$. A primeira camada de esmalte secretada é conhecida como esmalte aprismático e esse primeiro aporte mineral do esmalte marca uma alteração celular nos ameloblastos: o desenvolvimento dos processos de Tomes, prolongamentos citoplasmáticos com atividade secretora. A secreção protéica pelo processo de Tomes ocorre em duas regiões distintas: a porção apical, responsável pelo desenvolvimento do esmalte prismático, e as porções laterais, responsáveis pela formação do esmalte interprismático. A orientação dos cristais é a única diferença entre os esmaltes prismático e interprismático (11,12).

Essa matriz orgânica recém-secretada pelos ameloblastos é composta principalmente por duas classes de proteínas: as amelogeninas, envolvidas com a formação de 90% da matriz orgânica do esmalte e as não-amelogeninas – enamelinina, ameloblastina, tuftelina, amelotina, Kalikreina 4 e MMP-20 – que constituem os 10% restantes (13-16). Acredita-se que a função das amelogeninas seja regular a orientação, formato e crescimento dos cristais de esmalte (17-19). Sabe-se que a quantidade de matriz orgânica secretada determinará a espessura final do esmalte (20). Nesta fase de secreção, já é iniciado o processo de mineralização do esmalte.

A fase de maturação do esmalte marca o momento em que ocorre uma série de alterações morfológicas significativas nos ameloblastos, como redução do volume celular e conteúdo de organelas citoplasmáticas. Estas mudanças possibilitam a progressão do processo de mineralização do tecido, que é possível em virtude da degradação e remoção das porção protéica por enzimas proteolíticas, as proteinases (18,19). Concomitantemente à remoção dos componentes orgânicos e água da matriz, existe um influxo de íons PO_4 e Ca^{+2} , fato que permite o crescimento dos cristais de hidroxiapatita em largura e espessura, culminando na fusão entre vários deles (6,11). Após a completa maturação do esmalte, os ameloblastos sofrem alterações como o desaparecimento do processo de Tomes, o rearranjo da sua estrutura interna e, em muitas espécies, uma redução de aproximadamente 50% da altura celular (15). Ainda que não apresentem, nesta etapa, função secretora, os ameloblastos protegem e isolam o esmalte maduro do tecido conjuntivo subjacente até a erupção do dente na cavidade bucal, quando então essa camada celular é perdida (8,11).

1.2.2 Composição do esmalte

O esmalte do dente erupcionado apresenta alto conteúdo inorgânico, aproximadamente 97%, representado por cristais de fosfato de cálcio, sob a forma de hidroxiapatita, com consideráveis quantidades de carbonato, sódio, magnésio, cloreto, potássio e flúor. As proteínas amelogeninas, não-

amelogeninas, proteinases, carboidratos e lipídios constituem 1% e a quantidade de água no tecido consiste em aproximadamente 2% do volume de sua estrutura. O esmalte do dente erupcionado é o único tecido mineralizado completamente acelular (11,21,22).

Os cristais de hidroxiapatita carbonatada se arranjam de maneira a deixar os prismas muito próximos uns aos outros. Cada prisma é separado um do outro por uma camada muito fina de matriz orgânica basicamente protéica e apresentam orientação perpendicular à JAD (23,24). A natureza cristalina e alta dureza do tecido devem-se ao alto conteúdo de sua fase inorgânica o que, em contrapartida, confere ao tecido um aspecto de friabilidade.

1.2.3 Amelogênese imperfeita

As alterações e defeitos que ocorrem durante a amelogênese podem ser de etiologia variável, podendo incluir fatores locais, sistêmicos, genéticos e ambientais (25-28). Uma destas alterações é a deposição inadequada da matriz orgânica do esmalte durante a fase secretora da amelogênese, cujo resultado é a hipoplasia do esmalte, na qual observa-se uma camada de esmalte mais fina.

O acometimento do esmalte hipoplásico pode variar desde pequenas depressões ou linhas horizontais até a ausência completa do tecido, fatos que caracterizam um defeito quantitativo (6,29). A distribuição dos defeitos pode ser localizada ou generalizada (30).

Além dos distúrbios da fase secretora, podem ocorrer alterações restritas à fase de mineralização ou maturação do esmalte, com desordens no processamento protéico e no crescimento dos cristais de hidroxiapatita. Nestas condições, apesar da espessura normal do esmalte, o tecido apresenta-se menos mineralizado e, clinicamente, manifesta-se sob o aspecto de uma opacidade, restrita ou difusa. Este defeito qualitativo do esmalte resulta num tecido mais quebradiço, poroso e com maior tendência a sofrer pigmentação extrínseca. Em pacientes acometidos por hipomineralizações mais graves,

mesmo que o dente tenha erupcionado com o esmalte em espessura normal, o tecido tende a se desgastar ou fraturar facilmente. Nestes casos, condições clínicas como hipersensibilidade dentinária, propensão à formação de cálculo com desenvolvimento de periodontite severa e crônica, além de perda da dimensão vertical de oclusão, devido à abrasão dental, são freqüentes (6,29).

A amelogênese imperfeita (AI) pode ser definida como um grupo de condições genéticas que podem afetar o esmalte dentário tanto quantitativa quanto qualitativamente, com ou sem associação a outras alterações sistêmicas ou síndromes (31,32). A prevalência da AI varia bastante dependendo da população estudada, sendo encontrados valores que vão desde 1.4 /1.000 a 1/14.000 e 1/16.000 (26,33,34).

A AI é caracterizada por manifestações clínicas bem diversificadas e por uma heterogeneidade genética e fenotípica (35). O esmalte afetado pode apresentar distúrbios na coloração, espessura, lisura, dureza e resistência e, conseqüentemente, os pacientes têm uma maior propensão a desenvolver lesões de cárie, doenças periodontais, distúrbios oclusais e geralmente apresentam hipersensibilidade em função da exposição dentinária precoce. Estes pacientes freqüentemente apresentam dificuldades em manter uma boa higiene oral e possuem baixa auto-estima em virtude da aparência estética dos seus dentes (6,36). A diversificada aparência clínica desses defeitos resultou na elaboração de uma classificação com até 14 diferentes tipos de AI, sendo reconhecidos três grupos principais: hipoplásico, hipomaturado e hipocalcificado (26,29,37). Apesar da classificação, a distinção entre os tipos de AI, sob o aspecto clínico, não é uma tarefa simples (28).

As manifestações clínicas diversificadas no esmalte afetado pela AI não-sindrômica são resultado de mutações genéticas que causam alterações em algumas proteínas envolvidas na formação do esmalte. Os genes identificados são o *AMELX* (gene responsável pela codificação das amelogeneinas), *ENAM* (gene responsável pela codificação da enamelinina), *KLK4* (gene responsável pela codificação da kalikreína, protease responsável pela degradação das amelogeninas), *MMP-20* (gene responsável pela codificação da enamelinina, uma proteinase dependente de cálcio, que é membro da família das MMPs)

(38-42). Durante avaliações em famílias diagnosticadas com AI, algumas outras mutações foram identificadas em genes que não apresentam uma função reconhecidamente relacionada à amelogenese, como o *FAMH83*, *WDR72*, *DLX3* e *C4ORF26* (43,44). Ao considerar as bases moleculares de pacientes afetados por AI sindrômicas, já é estabelecida uma associação entre mutações no gene *FAM20A* e a ocorrência de AI e hiperplasia gengival (45). Recentemente, uma nova mutação no gene *LAMB3* foi identificada como causadora de AI dominante hipoplásica (46).

Tendo em vista que o diagnóstico molecular ainda não é elucidativo para todos os tipos de AI, o diagnóstico atual é baseado em evidências clínicas e radiográficas, em análises e coletas de informações de antecedentes familiares e, quando possível, pela investigação do modo de herança genética. A dependência de características fenotípicas para a determinação do diagnóstico de determinadas alterações já provou não ser tão fidedigna quanto algumas investigações genético-moleculares porque deve-se considerar que muitos destes pacientes já apresentam tratamentos reabilitadores executados (31).

Ao ser analisado em microscopia eletrônica de varredura, o esmalte de dentes afetados por AI do tipo hipoplásica apresentou-se com porosidades, depressões e micro-cavidades bem delimitadas em áreas amolecidas ou aprismáticas com estrutura semelhante à favo de mel e textura granular. Esta irregularidade na morfologia dos cristais poderia estar relacionada com as funções alteradas dos ameloblastos (47-49). Em casos indicativos de hipomineralização, já foram evidenciadas algumas características, como: segmentação dos prismas de esmalte, apresentação dos prismas em tamanhos diferentes sem limites definidos, bem como cristais amorfos e desordenados (50-53).

Não existem evidências de que os tecidos dentinário e pulpar estejam afetados na AI, mas a exposição do tecido dentinário ao ambiente bucal em função do desgaste ou fratura precoce do esmalte afetado pode suscitar em alterações fisiológicas protetoras do tecido dentinário. Uma análise dentinária em dentes com AI do tipo hipocalcificado verificou a presença de túbulos dentinários parcialmente obliterados, regiões com falta de distinção entre as

dentinas peritubular e intertubular e um maior conteúdo de cálcio (54). Embora sejam necessários mais estudos para a confirmação destes achados e, principalmente, para a elucidação do real motivo deflagratório dessas alterações dentinárias, estas informações são importantes para o conhecimento acerca de possíveis alterações no padrão estrutural e de mineralização da dentina em resposta às alterações do esmalte, assim como para a verificação de alguma influência que essas alterações possam exercer no prognóstico de eventuais tratamentos restauradores.

1.3 Dentinogênese

A dentinogênese é o processo de formação da dentina, um tecido mineralizado que constitui a maior parte da estrutura dentária, e as células reguladoras desse processo são os odontoblastos, células pós-mitóticas ectomesenquimais que têm como função a síntese, secreção e controle da mineralização da matriz dentinária durante e após a formação do dente (55,56).

O processo de diferenciação celular dos odontoblastos ocorre a partir de interações entre as células do epitélio interno do órgão do esmalte e as células periféricas da papila dentária. À medida em que se inicia a diferenciação destas células em odontoblastos, ocorre uma diminuição da relação núcleo/citoplasma, o RER se desenvolve e é verificada a presença de numerosos ribossomos no citossol, características de células secretoras (55). Neste momento, os odontoblastos secretam a matriz extracelular dentinária, constituída basicamente por fibrilas de colágeno do Tipo I associadas à substância fundamental amorfa. Essa estrutura, denominada de dentina do manto, inicia seu processo de mineralização por meio das vesículas da matriz, que são microesferas de 50 a 150 nm de diâmetro que contêm cristais de apatita que, durante seu crescimento, fundem-se possibilitando a mineralização da matriz orgânica. O imbricamento desta dentina com a matriz de esmalte, recém-secretada pelos ameloblastos, determinará a formação da junção amelodentinária (JAD) (55,57-60). Após completado o processo de mineralização da dentina do manto, uma camada de dentina não-mineralizada

e sem túbulos dentinários, a pré-dentina, de aproximadamente 15 a 20 μm de espessura, permanece presente justaposta à camada de odontoblastos (55).

Os processos de secreção e subsequente biomineralização da matriz orgânica dentinária são contínuos ao longo da vida (55). Essa dentina mineralizada, denominada circumpulpar, compõe o corpo da dentina e é constituída por fibrilas colagênicas mais finas e mais densamente compactadas em comparação às encontradas na dentina do manto (56). À medida que a dentinogênese progride, os odontoblastos desenvolvem prolongamentos citoplasmáticos que ficam envolvidos pela dentina recém-mineralizada, fato que propicia a formação dos túbulos dentinários, que são uma característica peculiar do tecido (56). Os túbulos dentinários são distribuídos de forma radial a partir da polpa até a JAD e as fibrilas de colágeno interfibrilar estão orientadas perpendicularmente a eles (61).

A convergência destes túbulos em direção à câmara pulpar é responsável pela variação regional da densidade, diâmetro e orientação tubulares. O diâmetro de cada túbulo varia de 0,8 e 2,5 μm entre a JAD e a região próxima à polpa, respectivamente. O número de túbulos dentinários é, dessa forma, menor por área na junção amelodentinária e maior por área na região de pré-dentina, próxima à câmara pulpar. Calcula-se que existam aproximadamente 15.000 túbulos por mm^2 na dentina periférica (próxima à JAD) e 45.000 túbulos por mm^2 na região mais próxima à polpa (62). Os túbulos dentinários são preenchidos por um fluido proveniente da polpa dentária, prolongamentos citoplasmáticos dos odontoblastos, fibras nervosas e fibrilas de colágeno não-mineralizadas (63,64). Sugere-se que cada odontoblasto possua um prolongamento celular dentro de cada túbulo dentinário (55).

A presença dos túbulos distingue, na dentina circumpulpar, dois tipos de tecido: a dentina peritubular e a intertubular. A dentina peritubular consiste no tecido das paredes dos túbulos dentinários, é altamente mineralizada (95% do seu volume) e formada pela secreção de proteínas não-colagênicas oriundas dos prolongamentos odontoblásticos, sofrendo rápida mineralização. Ao longo da vida, existe uma deposição contínua da dentina peritubular. A dentina

encontrada entre os túbulos dentinários é denominada intertubular e este tipo de dentina é formada por proteínas colagênicas e não-colagênicas, sendo menos mineralizada que a dentina peritubular, com aproximadamente 30% do seu volume constituído por mineral (55). Dessa forma, a dentina pode ser considerada como um complexo compósito hidratado formado basicamente por túbulos dentinários envoltos por uma zona peritubular altamente mineralizada, que se encontra imersa numa matriz intertubular, constituída por colágeno do tipo I, cristais de hidroxiapatita e fluido dentinário (65).

A dentina é ainda classificada em dentina primária, secundária e terciária, de acordo com o momento em que é formada. A dentina primária é o tecido desenvolvido durante a odontogênese até o momento em que a formação radicular permita a erupção do dente na cavidade bucal e exista a completa formação do ápice radicular. Este momento marca o início da formação da dentina secundária, que ocorre ao longo da vida do indivíduo e numa velocidade de formação bem reduzida em comparação à primeira. O tecido dentinário terciário é formado em resposta à estímulos externos como lesões de cárie, atrição, tratamentos restauradores ou traumas (66).

1.3.1 Composição da dentina

A dentina é composta basicamente por matéria inorgânica, mineral, na forma de hidroxiapatita carbonatada, em aproximadamente 70%; 20% por material orgânico e 10% por fluido dentinário pobremente organizado. Entretanto, ao se considerar o volume ocupado no tecido, a porção inorgânica, orgânica e água representam respectivamente, 50%, 30% e 20% (67,68).

O fluido dentinário encontra-se majoritariamente nos túbulos dentinários, 75%, enquanto o restante é distribuído dentro da matriz intertubular (69). Entretanto, mudanças estruturais, químicas e físicas ocorrem no tecido dentinário com o envelhecimento e uma desidratação natural ocorre em dentes de pacientes com mais de 50 anos de idade (70).

A constituição básica da fase inorgânica do tecido dentinário são os cristais de hidroxiapatita [$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH}_2)$], os quais apresentam estruturas e composições variadas, pois íons carbonato, citrato, sódio, magnésio, potássio, cloreto e flúor podem estar associados (71). Os cristais de hidroxiapatita normalmente estão intimamente associados com a matriz orgânica colagênica (55). Esta porção mineral da dentina ocupa duas regiões na malha de fibrilas de colágeno: intrafibrilar e extrafibrilar, esta última constituindo a maior parte da mineralização dentinária (72).

Aproximadamente 90% da matriz orgânica dentinária é composta por colágeno do Tipo I, Tipo I *trimer*, Tipo V e Tipo VI, sendo o restante composto por proteínas não-colagênicas (55,73). Estas proteínas não-colagênicas são fortemente associadas com a fase mineral do tecido dentinário e incluem a osteocalcina, osteonectina, proteína GLA da matriz e as proteínas pertencentes à família SIBLINGs (Small Integrin-binding Ligand, N-linked Glycoprotein), formada por glicofosfoproteínas que são expressas durante a formação e mineralização dentinária. A família SIBLINGs agrupa a maior quantidade de proteínas não-colagênicas da matriz dentinária, sendo elas: a osteopontina (OPN), a proteína fosfolirada da matriz extracelular (MEPE), a sialoproteína do osso (BSP), as proteínas da matriz dentinária (DMP-1) e a sialofosfoproteína da dentina (DSPP) (74-78).

A sialoproteína da dentina (DSP) e a fosfoproteína da dentina (DPP) são duas proteínas acídicas e não-colagênicas da matriz expressas a partir do gene da Sialofosfoproteína da dentina (DSPP) (79,80). Acredita-se que as DSPs sejam promotoras da precipitação de hidroxiapatita e que as DPPs sejam nucleadoras potenciais de mineralização dentro da matriz dentinária quando associadas às fibrilas de colágeno. As DPPs ainda teriam participação na biomineralização dentinária, modulando a formação dos cristais de hidroxiapatita na matriz e podendo ainda regular o tamanho e formato destes cristais (79,81). Por estes motivos, a sialofosfoproteína da dentina (DSPP) tem um papel importante na dentinogênese normal e patológica (82).

A relação existente entre a porção protéica não-colagênica e colagênica é fundamental para o pleno desenvolvimento do tecido dentinário.

1.3.2 Dentinogênese imperfeita

Os defeitos hereditários da dentina são classificados em dois grupos principais de acordo com aspectos clínicos e radiográficos: dentinogênese imperfeita, DGI, e displasia dentinária, DD (6,56,83,84). A DGI é o grupo mais comum de defeitos dentinários hereditários e afeta tanto a dentição decídua quanto a dentição permanente (26,60,82,85). Clinicamente, os dentes são caracterizados por uma coloração que varia desde o amarelado ao marrom-acinzentado, característica possivelmente relacionada a defeitos colagênicos. A dentina afetada é menos rígida e o esmalte altamente friável, fato que expõe a dentina prematuramente à cavidade oral levando o tecido dentinário a uma rápida atrição e abrasão (86).

O sistema de classificação de Shields foi desenvolvido para a dentição de pacientes afetados por DGI, tomando por base as características clínicas e radiográficas dentárias. Desse modo, esta condição dentinária é classificada em três subgrupos principais: Tipos I, II e III (83).

A dentinogênese imperfeita Tipo I é caracterizada por alterações dentinárias associadas à presença da osteogênese imperfeita (OI). A OI, por sua vez, consiste numa desordem hereditária autossômica dominante caracterizada por uma fragilidade óssea decorrente de defeitos moleculares na estrutura do colágeno, fato responsável pelas frequentes fraturas ósseas nos pacientes portadores (87,88). As variações no aspecto pulpar vão desde a aparência normal à obliteração total. Uma obliteração pulpar precoce, mesmo antes da erupção, pode ser observada (85). Os dentes afetados podem apresentar uma acentuada constrição cervical e menor comprimento radicular (83,86). Variações no fenótipo entre a DGI Tipo I e II são praticamente inexistentes.

A DGI Tipo II é o tipo classicamente dentinário, sem associação com qualquer desordem óssea (26,83). Essa alteração é uma das desordens dentárias mais comuns, com prevalência estimada de 1/6.000 e 1/8.000 nos Estados Unidos (89). As alterações dentinárias deste tipo de DGI afetam

essencialmente as proteínas não-colagênicas, especialmente a DSPP, com repercussões na mineralização da matriz dentinária (90). Os dentes decíduos podem ser mais afetados que os permanentes. A dentina apresenta-se com áreas amorfas na região tubular e irregularidade na apresentação dos túbulos dentinários (82,91). Existem evidências da presença de regiões com túbulos dentinários bem formados e corretamente dispostos e orientados coexistindo com regiões dentinárias com menor número de túbulos, pobre orientação e não completamente formados (92). As características clínicas e radiográficas são muito semelhantes entre os dentes afetados pelas DGI tipos I e II.

A DGI Tipo III foi primeiramente encontrada num isolado tri-racial de Brandywine, ao sul de Maryland, EUA (93). Este tipo de DGI também não possui envolvimento ósseo, sendo restrito à dentina. A DGI Tipo III apresenta normalmente múltiplas exposições pulpares, com a câmara pulpar e condutos com aspecto de normalidade ou alargados. O esmalte destes dentes pode apresentar depressões isoladas. Radiograficamente, alguns dentes podem apresentar obliteração pulpar total. Uma possível relação entre alterações no gene da DSPP e a DGI Tipo III foi estabelecida (39). Dessa forma, as condições de DGI Tipo II e III não existiriam como entidades distintas, mas como graus de expressividade variável de uma mesma condição genética (84).

A etiologia dos defeitos dentinários hereditários tem sido investigada. Mutações no gene da DSPP provaram ser causadoras da DGI tipos II e III, além da DD Tipo II. Apesar de existirem outros genes candidatos, nenhum outro foi ainda identificado (84).

O tecido dentinário afetado por DGI apresenta uma quantidade de água 60% acima da média encontrada em dentina não-afetada (94). Ademais, o componente principal da porção inorgânica da DGI é a apatita carbonatada pobremente cristalizada. O tamanho e formato dos cristais não estariam alterados, mas o número dos cristais é reduzido. Foi constatada também uma diminuição significativa no conteúdo de magnésio e, em microscopia eletrônica de varredura, foram observados grandes espaços intercristalinos (95).

1.4 Propriedades mecânicas dos tecidos dentários

Segundo Xu, 1998 (96), o conhecimento das propriedades mecânicas de dentes humanos auxilia o planejamento dos tratamentos clínicos e poderá levar ao desenvolvimento de materiais restauradores com estrutura e propriedades físicas cada vez mais parecidas com aquelas da dentina e do esmalte.

O entendimento do comportamento mecânico de qualquer material ou tecido necessita do embasamento conceitual de suas propriedades mecânicas, que compreendem os diferentes tipos de respostas que os materiais ou tecidos apresentam às influências mecânicas externas. As propriedades mecânicas se manifestam pela capacidade do material em desenvolver deformações que podem ou não ser reversíveis e também pela resistência do mesmo até o ponto de fratura. A deformação é chamada de elástica se for reversível, ou seja, se a deformação desaparecer instantaneamente assim que as forças aplicadas sejam removidas, independentemente do tempo de aplicação da carga. Um material que possui deformações reversíveis, mas cuja reversibilidade seja dependente do tempo, é denominado viscoelástico; neste caso, a deformação aumenta após a aplicação da carga, mas diminui lentamente após a remoção dela, resultando num relaxamento das tensões internas do material, fato que pode gerar uma deformação permanente (97).

1.4.1 Tração

Uma propriedade muito estudada é a resistência do esmalte ou da dentina à tração. Ela é avaliada pela aplicação de uma carga uniaxial crescente por unidade de área, representada pelo esboço de uma curva deformação-tensão, em que o tecido possa suportar até o momento de sua ruptura. Tensões de tração são tensões normais, pois agem em uma direção perpendicular à superfície de corte e são obtidas quando o espécime é esticado (98). Este tipo de ensaio mecânico, quando aplicado em espécimes com dimensões

reduzidas, é denominado ensaio de microtração, normalmente relacionado à avaliar resistências adesivas. Espécimes de dimensões reduzidas também são utilizados para a avaliação da resistência máxima à tração de materiais ou tecidos dentários.

Os testes de microtração ou resistência máxima à tração permitem avaliar a carga máxima suportada por espécimes, com formato de fatias ou palitos, com dimensões na área de seção transversal que variam de 0.3 a 1,5mm² e comprimento variável entre 3 e 7mm (11,99-103). A possibilidade da obtenção de um maior número de amostras a partir de um único dente e de se conseguir uma maior padronização das áreas de seção transversal consistem em importantes vantagens deste tipo de ensaio frente ao ensaio de tração convencional. Em virtude das dimensões reduzidas dos espécimes, a técnica de preparação dos mesmos é sensível e exige cautela do operador (101,104-106). O alinhamento dos espécimes durante este tipo de ensaio também é uma dificuldade frequentemente enfrentada (96).

O dispositivo de testes pode interferir no padrão de distribuição de forças através do espécime (107). Um dispositivo ideal deve propiciar um posicionamento correto do espécime durante a sua fixação e eliminar a possibilidade de ocorrência de esforços espúrios durante este tipo de ensaio mecânico.

As unidades de medida de tensão no sistema internacional são Newtons por metro quadrado (N/m²), isto é, Pascal (Pa). Em geral, devido aos elevados valores de tensão para os materiais, principalmente de engenharia, utiliza-se o Megapascal (MPa), que equivale a 10⁶ Pa (98).

1.4.2 Compressão

Assim como o limite de resistência à tração é estudado, a resistência do tecido à aplicação de cargas no sentido oposto também é avaliada. A resistência à compressão dos tecidos dentários mineralizados é determinada pela força máxima necessária, sob velocidade de deformação constante, para que ocorra o rompimento do tecido estudado posicionado entre superfícies ou

placas paralelas, sob a ação de cargas uniaxiais que agem quando o espécime é esmagado sem que ocorram esforços espúrios.

Adicionalmente, a indicação da rigidez do tecido dentário mineralizado é fornecida pelo módulo de elasticidade ou Módulo de Young, e vai depender das forças de ligações interatômicas do espécime. Esta grandeza consiste na razão entre a tensão convencional ou de engenharia – força por unidade de área que atua em um determinado plano de um material submetido a uma carga – pela deformação convencional ou alongamento específico, ambos no regime elástico, ou seja, em condições de total reversibilidade (108,109). Quanto maior o módulo de elasticidade, menor a deformação elástica resultante na aplicação de uma carga (110).

Resistência máxima à tração, resistência máxima à compressão e módulo de elasticidade são exemplos de propriedades mecânicas que refletem o comportamento da microestrutura dos tecidos dentários às cargas impostas pela função na cavidade oral. As tensões mastigatórias às quais os dentes estão constantemente sujeitos em consequência da força muscular exercida são principalmente compressivas e de cisalhamento (110). A composição mineral e orgânica, além das características microestruturais dos tecidos dentários apresentam relação com as propriedades mecânicas inerentes a estes tecidos. As falhas que ocorrem em esmalte e dentina são afetadas pela energia, resiliência e formato dos corpos impactantes; além disso, a direção e angulação destes, área de impacto, natureza tecidual da estrutura de suporte, geometria espacial do dente e microestrutura dentária afetam a resistência destes tecidos (111).

1.4.3 Propriedades mecânicas da dentina

As propriedades mecânicas da dentina dependem da densidade e orientação tubular, grau de mineralização quanto à proximidade do tecido pulpar, permeabilidade e umidade tecidual, além da quantidade, tamanho, estrutura e aglomeração das partículas de hidroxiapatita nas diferentes regiões dentinárias, fatos que fazem deste tecido um material anisotrópico

(61,110,112). Os cristais de hidroxiapatita conferem força enquanto as fibrilas de colágeno conferem resistência ao tecido dentinário (65). Menor módulo de elasticidade e menor dureza da dentina em comparação ao esmalte estariam associados a um maior conteúdo orgânico da dentina (113).

A dentina possui um comportamento viscoelástico, assim como a maioria dos tecidos biológicos. Uma deformação aplicada num material viscoelástico induz à formação de tensões neste material. Se outra carga não for aplicada, essas tensões tendem a diminuir com o tempo e o material exibe um relaxamento delas, mas associado a uma deformação permanente no material, o que pode diminuir a sua resistência (114). Os mecanismos que controlam o comportamento viscoelástico da dentina e a possível dependência deles à carga aplicada ainda permanecem desconhecidos (61).

O tamanho reduzido dos cristais minerais propicia uma maior concentração dessas estruturas entre as fibrilas colagênicas, fato responsável pela mineralização intrafibrilar (110). Uma diminuição da espessura das partículas minerais é correlacionada com o aumento do conteúdo mineral e conseqüentemente com o aumento da dureza e do módulo de elasticidade do tecido. A correlação positiva entre dureza e módulo de elasticidade tanto do esmalte quanto da dentina sugere que ambos aumentem com o aumento do conteúdo mineral (110,115). A dentina do manto apresenta uma dureza levemente menor que a dentina circumpulpar, com evidências de menor conteúdo mineral no primeiro. Essa menor dureza é acompanhada de menor módulo de elasticidade também na região próxima à JAD, consistindo num obstáculo efetivo para a propagação de trincas.

A dentina circumpulpar apresenta propriedades mecânicas e estruturais que a caracterizam como um gradiente mineral ótimo para a função mecânica. Essa dentina apresenta uma diminuição da dureza à medida que se aproxima da região pulpar. Fatores como aumento da densidade e dos diâmetros dos túbulos dentinários, diminuição da quantidade de dentina intertubular e menor espessura das partículas minerais corroboram para esta evidência (110,116-118). O fluido dentinário intratubular pode funcionar como uma transferência hidráulica que também ajuda a dissipar as forças oclusais aplicadas ao dente

(119).

Acredita-se que a matriz dentinária intertubular domine o comportamento mecânico da dentina e que os túbulos contribuam somente de maneira superficial sobre as propriedades mecânicas do tecido (120).

As propriedades mecânicas da dentina são estudadas de diversas maneiras. Alguns estudos levam em consideração o fato dos dentes serem submetidos a várias cargas cíclicas durante a mastigação. As falhas por fadiga ocorrem quando pequenos defeitos presentes na estrutura dentária ou que tenham surgido em decorrência da aplicação de alguma carga excessiva são submetidos à ação de forças constantes, ou até mesmo menores do que as teoricamente suportadas, mas que propagam-se e resultam em falhas permanentes no dente (121). As falhas iniciam-se de imperfeições, que podem ser intrínsecas, provavelmente em regiões com alterações na mineralização, ou extrínsecas, como preparo cavitário, sobrecarga durante função na cavidade oral ou traumas (61).

Adicionalmente aos ensaios de fadiga, vários tipos de testes mecânicos são executados para melhor compreender o comportamento dentinário, como: ensaios monotônicos de tração e compressão, microdureza e nanodureza.

Bowen e Rodrigues, 1962 (122), verificaram valor médio de 52 Mpa em resistência à fratura por tração convencional. Lehamn, em 1967 (123), verificou valores de resistência à tração convencional da dentina que variaram, individualmente, entre 21 e 53 MPa. Sano *et al.*, em 1994 (124), verificaram valores de média de resistência dentinária, em ensaios de microtração, que variaram entre 93 a 105,5 MPa, dependendo da velocidade do deslocamento da máquina de testes (0.05mm/min e 2,54mm/min) e do formato do espécime (formato de ampulheta com ângulos internos arredondados e formato de ampulheta com ângulos internos vivos), respectivamente. Durante a realização dos ensaios de microtração, a obtenção de valores iguais ou abaixo de 40 MPa pode estar relacionada ao desenvolvimento de defeitos no tecido dentinário durante a preparação dos espécimes (61,123).

Os ensaios de compressão exibem valores máximos de resistência compressiva da dentina com variações consideráveis, 207 a 340 Mpa, que

podem advir tanto do preparo do espécime e da região dentária da qual o espécime foi obtido ou da temperatura sob a qual os espécimes estejam acondicionados (125,126). Craig e Peyton, em 1958 (125), verificaram uma média dos valores de resistência máxima à compressão da dentina, com espécimes em formato de cubo, de 43.100 psi que, convertidos em MPa, equivalem aproximadamente a 297Mpa. Watts *et al.*, em 1987 (126), verificaram uma variação dos valores de resistência compressiva, em espécimes de formato retangular, obtidos no sentido mesio-distal, entre 207 a 297 MPa, dependendo da temperatura à qual os espécimes estavam acondicionados, sendo os valores mais baixos relacionados aos espécimes acondicionados à temperatura de 80° C e os maiores à temperatura de 0° C. Segundo Zaytsev, 2012 (127), a dentina, que é um tecido com alta elasticidade e plasticidade, parece apresentar valores de propriedades mecânicas compressivas mais dependentes do formato e técnica de preparação dos espécimes do que por outras razões.

A orientação de aplicação de carga e do deslocamento também interferem na resistência do tecido dentinário. Rasmussen *et al.*, 1976 (128) e 1984 (111), constataram que as fraturas dentinárias ocorrem mais facilmente quando a orientação da carga ou deslocamento aplicados sejam perpendiculares aos túbulos dentinários e como a disposição da malha colagênica aparentemente se apresenta perpendicular aos túbulos, forças perpendiculares a eles ocasionariam o rompimento do espécime entre as fibrilas colagênicas de maneira mais fácil, enquanto forças paralelas aos túbulos teriam uma maior dificuldade. A própria orientação tubular, também interfere nos resultados relacionados aos ensaios mecânicos da dentina (129,130-132). Carvalho *et al.*, 2001 (132), observaram que a resistência à tração máxima de fatias de dentina ,com redução da área central para a obtenção de uma seção transversal de 0.5mm², foi maior para espécimes cuja carga aplicada foi perpendicular à orientação tubular quando comparada à carga paralela à orientação tubular. Liu *et al.*, em 2002 (129), verificaram também a influência da orientação tubular na resistência máxima à tração de dentina radicular bovina. Espécimes com orientação tubular oblíqua ao deslocamento aplicado apresentaram valores de

resistência consideravelmente maiores que espécimes com orientação tubular paralela ou perpendicular à carga aplicada.

Os altos valores de desvio-padrão, comuns às medidas de tensão de ruptura dentinária, sugerem que esta força é controlada por uma distribuição de interferências estruturais do espécime ou de falhas originadas no preparo do mesmo. A presença de defeitos no tecido fará com que os espécimes falhem com tensões de magnitude menor do que materiais com menor quantidade dessas variáveis (61).

Apesar de existirem diversos estudos que tentaram elucidar de maneira detalhada as propriedades mecânicas da dentina não-afetada, poucos são aqueles que trabalharam o tema em tecido dentinário acometido por doenças hereditárias.

1.4.4 Propriedades mecânicas da dentina em dentes afetados por AI e DGI

As propriedades mecânicas da dentina afetada pelas condições de DGI-II e AI são praticamente desconhecidas.

Segundo Kinney *et al.*, 2001 (133), a mineralização intrafibrilar pode estar ausente em dentes afetados por DGI-II e os níveis de mineralização tecidual podem corresponder a aproximadamente 67% do tecido dentinário não-afetado. Evidências sugerem que a mineralização intrafibrilar é o fator de maior relevância para a elasticidade e dureza do tecido, mesmo que responda pela menor parte do conteúdo mineral encontrado no tecido dentinário (134).

O módulo de elasticidade, a dureza e a concentração mineral já foram avaliados em espécimes hidratados e desidratados afetados por DGI-II *in vitro*. O módulo de elasticidade e a dureza da dentina afetada foram menores quando comparados aos espécimes de dentes não-afetados. Uma relação diretamente proporcional foi estabelecida entre o módulo de elasticidade e a dureza com a concentração mineral em espécimes afetados ou não-afetados desidratados, mas essa relação não foi verificada com espécimes hidratados

(72). Tudo indica que, nestas circunstâncias, a dentina pode apresentar um baixo módulo de elasticidade e resistência à abrasão mesmo tendo uma mineralização próxima aos níveis de concentração mineral da dentina não-afetada (70 a 90%) (72). Em contrapartida, a desidratação tecidual faz com que existam pequenas contrações nas fibrilas colagênicas que geram estresses compressivos que estabilizam a matriz granular e possibilitam o aumento do módulo de Young.

Propriedades mecânicas em tecido dentinário de dentes afetados pela condição de AI ainda são desconhecidas.

Valores de resistência a ensaios monotônicos de tração e compressão do tecido dentinário afetado por DGI-II e AI, até o presente momento, não foram descritos na literatura.

Etapas da pesquisa

Este estudo foi dividido em duas etapas. A primeira refere-se ao desenvolvimento de um dispositivo de testes mecânicos para a execução dos ensaios de resistência máxima à tração e à compressão. A validação do dispositivo foi feita mediante a execução de um ensaio de microtração para avaliar resistência adesiva em dentina. A segunda etapa do estudo refere-se à obtenção dos dados relacionados às propriedades mecânicas da dentina, especificamente em ensaios de RMT e RMC, em dentes afetados pelas condições de AI e DGI-II.

PARTE 1

Dispositivo Flextest/ Validação do dispositivo

2. Objetivos

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

Desenvolver um dispositivo para ensaios mecânicos de RMT e RMC.

2.2 Objetivo específico

Testar a seguinte hipótese:

O dispositivo desenvolvido possibilita a realização de ensaios de RMT e RMC.

3. Metodologia

3. Metodologia

O estudo de validação do dispositivo de ensaios mecânicos (Flextest) fez parte do projeto submetido e aprovado pelo Comitê Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP), Ministério da Saúde – MS, no dia 13 de outubro de 2009, sob o protocolo de número 078/09.

3.1 Amostra

3.1.1 Seleção da Amostra

Todos os pacientes que concordaram em participar deste estudo assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido. Os pacientes doadores são indivíduos jovens, com faixa etária entre 17 e 25 anos.

Quinze dentes terceiros molares humanos, semi ou totalmente erupcionados mas sem função oclusal, sem cavitações ou presença de materiais restauradores, foram extraídos e imediatamente armazenados em frascos individuais com Timol a 0,1% para evitar crescimento bacteriano (135,136). O período máximo de armazenamento foi de 3 meses. Todos os dentes do estudo apresentaram indicação clínica para exodontia e foram doados por pacientes não-afetados por nenhuma desordem genética ou sistêmica.

3.1.2 Preparo da amostra

O preparo da amostra foi realizado por um operador. Coroas de resina composta (Z250, A2 shade, 3M™ ESPE™, St. Paul, MN-EUA) de 6mm foram confeccionadas sobre dentina exposta após a remoção do esmalte oclusal com disco de lixa diamantado (KG Sorensen, SP-Brasil) montado em máquina de cortes Secotom (Struers, Ballerup-Dinamarca) e tratamento adesivo prévio de acordo com as instruções do fabricante (Tab.1).

Tabela 1 - Sistema adesivo utilizado no estudo e técnica de aplicação de acordo com as normas do fabricante. Composição fornecida pelo fabricante: HEMA = hidroxietil metacrilato; Adper Single Bond

Adesivo	Adper™ Single Bond 2/Plus (3M™ ESPE™, St. Paul, MN-EUA)
Composição	Condicionamento ácido: ácido fosfórico a 37% (3M™ ESPE™, St. Paul, MN-EUA) [4BT], Primer e Adesivo: dimetacrilatos, , HEMA, copolímero de ácido polialcenóico modificado, carga de sílica coloidal de 5nm tratada com silano, etanol, água, fotoiniciador
Técnica de Aplicação	Condicionamento ácido por 15 segundos; Lavagem por 10 segundos; Remover excesso de água; Aplicar 2 a 3 camadas consecutivas do adesivo por 15 segundos com leve agitação; Aplicar leve jato de ar por 5 segundos e Fotopolimerizar por 10 segundos.

Os dentes foram armazenados em água destilada, por 24 horas, antes da confecção dos espécimes e realização dos ensaios de microtração. Espécimes de resina/dentina em formato de palito foram confeccionados e imediatamente testados. Cem espécimes foram obtidos e divididos em dois grupos: Flextest (cinquenta espécimes obtidos de sete dentes) e Bencor Multi-T (cinquenta espécimes obtidos de oito dentes).

3.2 Equipamentos

O projeto do novo dispositivo para ensaios de RMT e RMC foi desenvolvido por engenheiros mecânicos da Universidade de Brasília (Brasília, DF-Brasil) e da empresa Mitay Mecânica Industrial de Precisão Ltda. (Cotia, SP-Brasil). O dispositivo foi batizado de Flextest por ter sido desenvolvido com

a finalidade de realizar tanto ensaios de tração quanto ensaios de compressão.

O objetivo principal do dispositivo é, para os ensaios de RMT, garantir um posicionamento do espécime com máxima precisão e uma distribuição de forças por todas as faces do espécime fixado, sem ocorrência de esforços espúrios. O formato das bases de fixação dos espécimes, o alinhamento existente entre elas e ausência destes esforços espúrios permite também a execução de ensaios de compressão (Fig. 1).

Os ensaios de microtração para validação do dispositivo foram realizados em uma máquina de ensaios universal servo-hidráulica, MTS (MTS Systems Corporation, Minnesota-EUA), com capacidade de força de 100KN e capaz de realizar ensaios monotônicos (tração e compressão) bem como ensaios cíclicos (fadiga), pertencente ao Laboratório de Ensaio Mecânicos da Faculdade de Tecnologia - FT, UnB.

Em virtude das dimensões reduzidas dos espécimes, se fez necessário a utilização de uma célula de carga apropriada para os ensaios, SV 100 (ALFA instrumentos, São Paulo-Brasil), com capacidade nominal de 100Kg.



Figura 1 - Máquina de ensaios MTS com o dispositivo Flextest e célula de carga acoplados para realização dos ensaios de resistência adesiva à microtração.

O dispositivo Flextest apresenta uma mesa fixa e uma mesa deslizante com rolamento de microesferas montada em dois trilhos paralelos (Fig. 2).

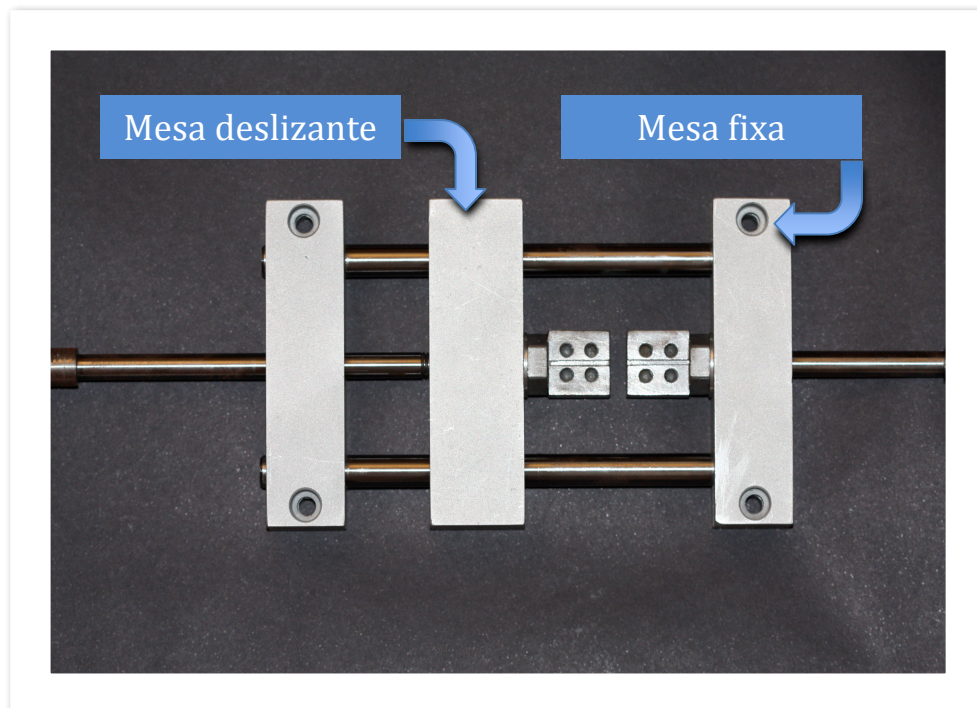


Figura 2 - Dispositivo desenvolvido para ensaios de RMT e RMC.

A movimentação da mesa deslizante sobre o trilho permite que o dispositivo não perca o alinhamento durante seu acionamento, resultando num ensaio de tração puro. O dispositivo apresenta ainda duas bases, uma acoplada a cada mesa, para a fixação dos espécimes. Cada base apresenta um entalhe de 0,8mm de profundidade e 1mm de largura, além de quatro furos para fixação de uma placa metálica por parafusos (Figs. 3 e 4). Essas mesmas bases apresentam superfícies planas que permitem o pleno contato de ambas quando as mesas são aproximadas. Este alinhamento das bases foi garantido no processo de desenvolvimento do dispositivo e possibilita a realização de ensaios compressivos.

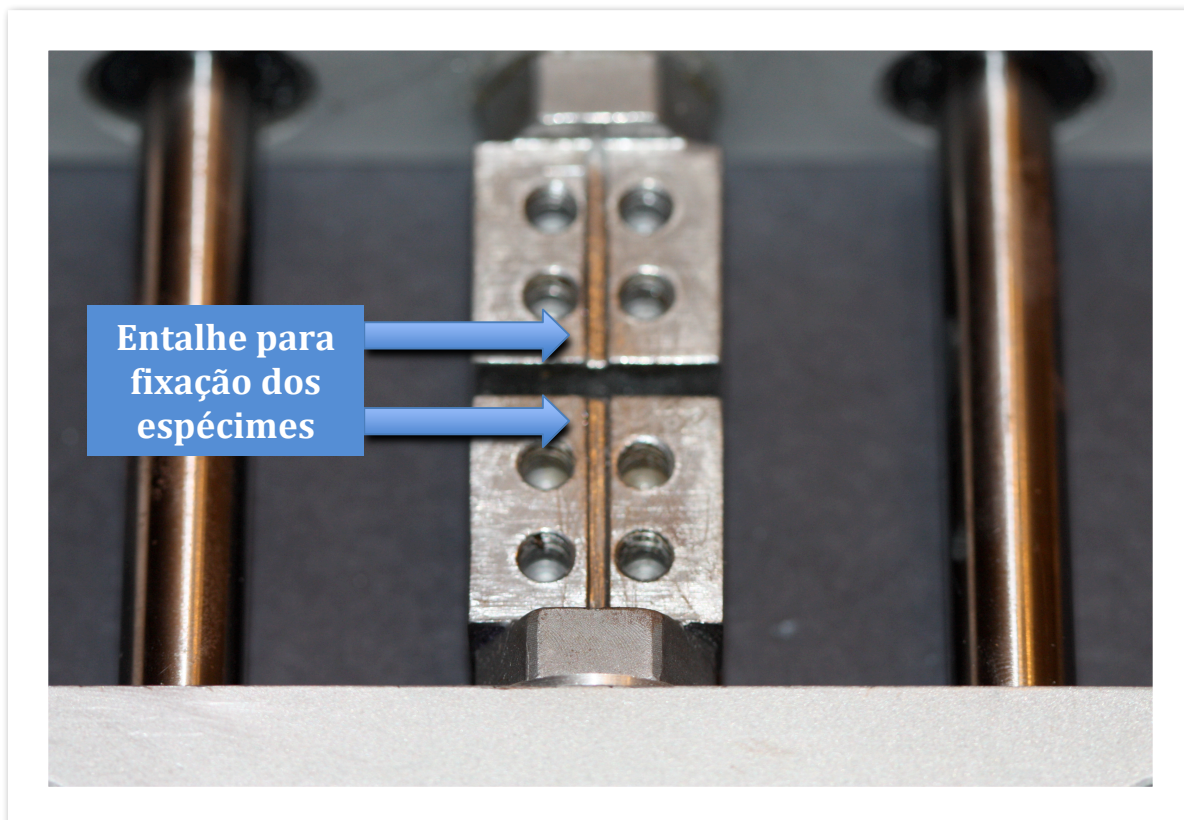


Figura 3 - Bases alinhadas e com entalhe central para fixação dos espécimes

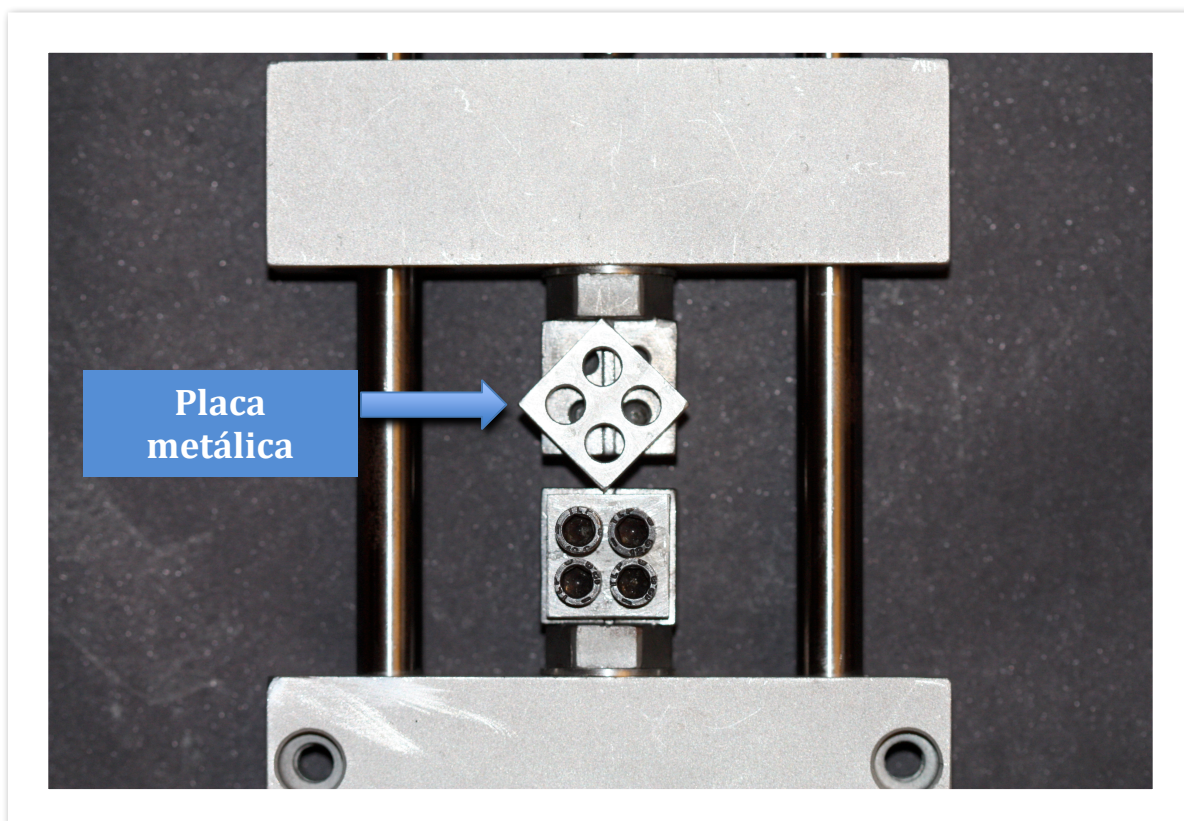


Figura 4 - Placas metálicas para auxílio de fixação dos espécimes

3.3 Ensaio para validação do dispositivo

A validação do dispositivo Flextest foi feita pela execução de ensaios de microtração em testes de resistência adesiva comparando-o à ensaios semelhantes realizados no dispositivo Bencor Multi-T (Danville Engineering Co., Danville-EUA), já consagrado (Fig. 5). Em virtude das dimensões reduzidas dos espécimes, se fez necessário a utilização de uma célula de carga apropriada para os ensaios – SV 100 (ALFA instrumentos, São Paulo, Brasil), com capacidade nominal de 100Kg.



Figura 5 - Dispositivos de testes montados na máquina de ensaios MTS. A – Dispositivo Flextest montado na MTS. B – Dispositivo Bencor Multi-T montado na MTS.

Os espécimes foram fixados aos dispositivos com um adesivo à base de éster de cianoacrilato (Superbonder Gel[®], Henkel Ltda., São Paulo, SP-Brasil), o qual tinha sua presa acelerada após aplicação prévia do acelerador 7452 (Loctite, Henkel Ltda., São Paulo, SP-Brasil). Após a completa fixação dos espécimes, a máquina de testes MTS era acionada a uma velocidade de deslocamento de 1.0mm/min até a fratura do espécime. Os valores da média da resistência adesiva foram obtidos para cada dente testado e para os dois grupos.

Adicionalmente, cada parte do espécime fraturado foi removida e avaliada em lupa estereoscópica (Metrimex/Pzo-Labimex, Hungria) em aumento de 40X para classificação quanto ao tipo de fratura observada: Adesiva (A); Coesiva em dentina (CD); Coesiva em resina (CR); além de eventuais tipos mistos de fratura.

3.4 Análise estatística

Os dados referentes à resistência adesiva foram obtidos por meio de testes de microtração, comparando-se dois tipos diferentes de dispositivos de ensaio. O primeiro dispositivo, considerado como grupo controle, é o Bencor Multi-T. O segundo dispositivo, considerado como grupo teste, é denominado Flextest Device.

O ensaio seguiu um delineamento de parcelas subdivididas, sendo os tipos de dispositivos considerados como as parcelas e os dentes submetidos a cada tipo de dispositivo como blocos (Fig. 6).

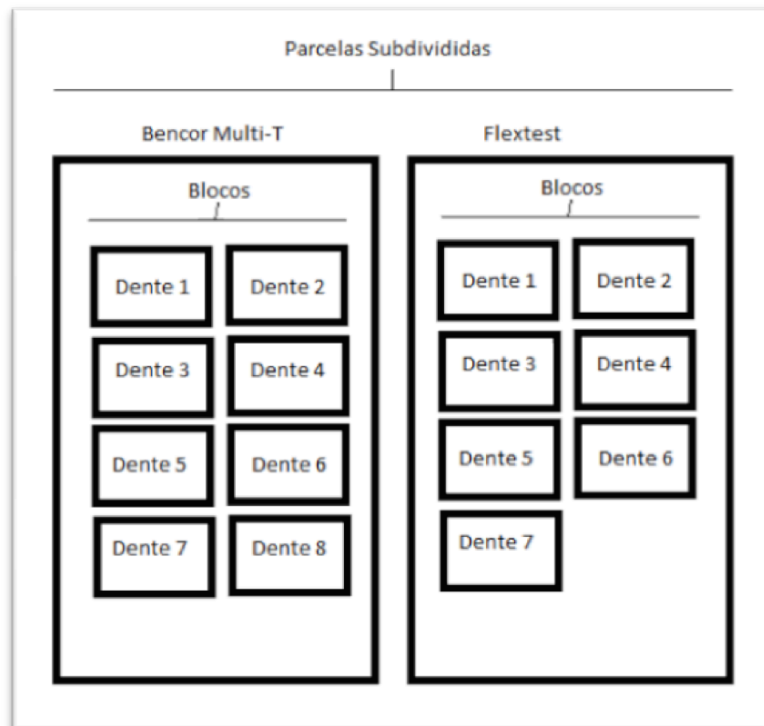


Figura 6 – Delineamento de parcelas subdivididas

Os resultados obtidos foram avaliados quanto ao padrão de distribuição dos dados por meio do teste de Lilliefors. A homogeneidade das variâncias entre os dois dispositivos foi avaliada por meio do teste de Levene. Uma vez que os dados encontravam-se em normalidade e em homogeneidade entre os dispositivos, foi utilizada a Análise de Variância Fatorial, seguido dos testes de acompanhamento de Fisher (*Least Square Difference*) para averiguar a hipótese nula de médias intra-grupo (blocos) e inter-grupo (parcelas) equivalentes.

Além disso, os números absolutos dos espécimes foram avaliados quanto ao tipo de fratura (A = adesiva; A + CR = adesiva + coesiva em resina; A + CD = adesiva + coesiva em dentina e A + CD + CR = adesiva + coesiva em resina e coesiva em dentina) em cada um dos dispositivos, e verificada a homogeneidade das frequências por meio do teste de Qui Quadrado para Independência, seguido pelo teste de acompanhamento de Resíduos Ajustados.

Em todos os testes utilizados na presente análise, foi estabelecido um nível de significância de 0,05.

4. Resultados

4. Resultados

Ao avaliar os dentes em cada um dos grupos foi possível verificar que houve diferença intra-grupos ($p < 0,05$). Entre os dentes submetidos ao dispositivo Bencor Multi-T foi possível verificar que o dente 4 apresentou significativamente a maior média ($58,31 \pm 14,11$), enquanto o dente 8 apresentou os menores valores de resistência ($20,17 \pm 6,01$). Os demais dentes apresentaram valores intermediários entre os dentes supracitados (Tab. 2 e Fig. 7).

Entre os dentes submetidos ao Flextext Device, também houve diferença estatística significativa entre os espécimes. Verificou-se que os dentes 2, 3 e 4 apresentaram significativamente os maiores valores de resistência adesiva ($43,47 \pm 8,36$; $42,13 \pm 7,76$; $42,13 \pm 9,62$, respectivamente), sendo acompanhado em sequência pelos dentes 6, 1, 7 e 5 (Tab. 02 e Fig. 07).

Em síntese, os dentes submetidos aos dois tipos de dispositivos apresentaram comportamentos diferentes entre si.

Tabela 2 – Comparações intra-grupo: Médias e Desvios padrão de resistência adesiva à microtração, em MPa, entre os dentes submetidos aos dispositivos Bencor Multi-T e Flextest.

Dispositivos	Dentes	n	Média	Desvio Padrão
Bencor Multi-T	Dente 1	6	26,58 cd	12,51
	Dente 2	5	30,16 cd	15,92
	Dente 3	7	48,38 ab	11,59
	Dente 4	7	58,31 a	14,11
	Dente 5	6	47,18 ab	17,88
	Dente 6	6	34,69 bc	8,17
	Dente 7	6	22,78 cd	9,12
	Dente 8	7	20,17 d	6,01
Flextest	Dente 1	9	37,93 ab	9,63
	Dente 2	8	43,47 a	8,36
	Dente 3	6	42,13 a	7,76
	Dente 4	6	42,13 a	9,62
	Dente 5	8	29,01 c	6,73
	Dente 6	7	38,61 ab	6,67
	Dente 7	6	30,66 bc	5,92

* as letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre as médias dos dentes de cada um dos dispositivos separadamente.

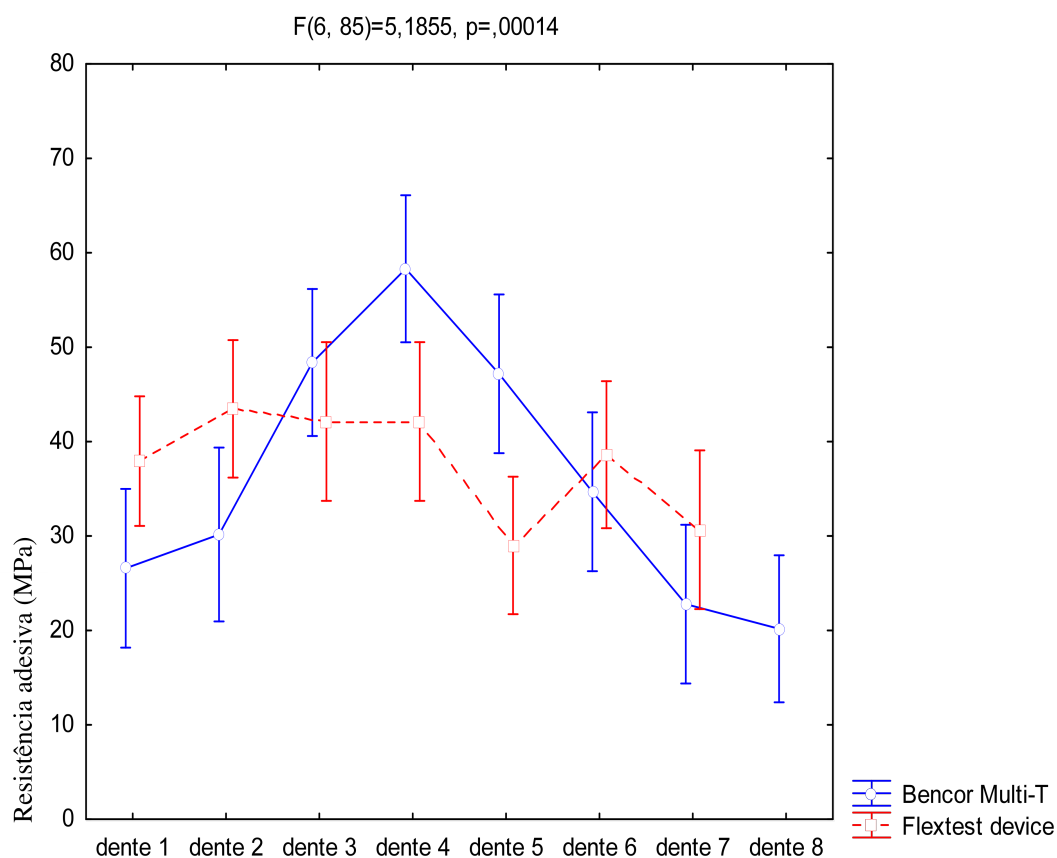


Figura 7 – Médias e intervalos de confiança (1,96*EPM) de resistência adesiva à microtração, em MPa, dos dentes submetidos aos dispositivos Bencor Multi-T e Flextest.

Apesar de existir as diferenças entre os dentes, o que indica a falta de um padrão de efeito dos respectivos dispositivos, foi realizada a comparação inter-grupo. Foi possível verificar que não houve diferenças estatísticas significativas entre os dois dispositivos ($p>0,05$), o que leva a crer que as médias de resistência adesiva são estatisticamente equivalentes entre grupos de dentes submetidos às diferentes microtrações (Tab. 3 e Fig. 8).

Tabela 3 – Comparações inter-grupo: Médias e Desvios padrão de resistência adesiva à microtração, em MPa, dos grupos de dentes submetidos aos dispositivos Bencor Multi-T e Flextest.

	n	Média	Desvio Padrão
Bencor Multi-T	50	36,52	17,59
Flextest device	50	37,62	9,22

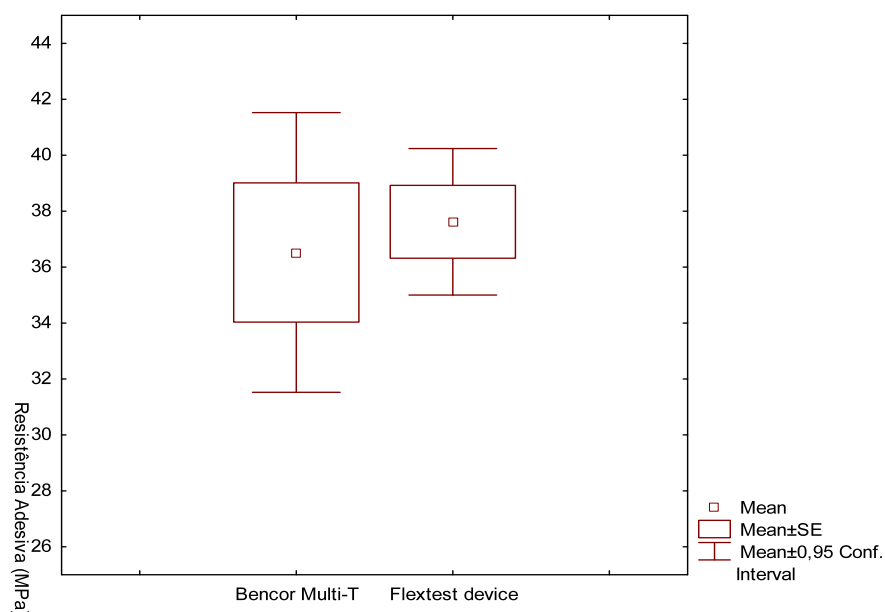


Figura 8 – Médias, erros padrão e intervalos de confiança ($1,96 \cdot \text{EPM}$) de resistência adesiva à microtração, em MPa, dos grupos de dentes submetidos aos dispositivos Bencor Multi-T e Flextest.

Quanto ao número de espécimes com diferentes tipos de fratura, foi possível verificar que os dois dispositivos promoveram as mesmas frequências, podendo-se considerar a homogeneidade de fraturas independentemente do tipo de dispositivo utilizado ($\chi^2=1,378$; $p=0,711$). A representação gráfica está expressa em percentual (Fig. 9).

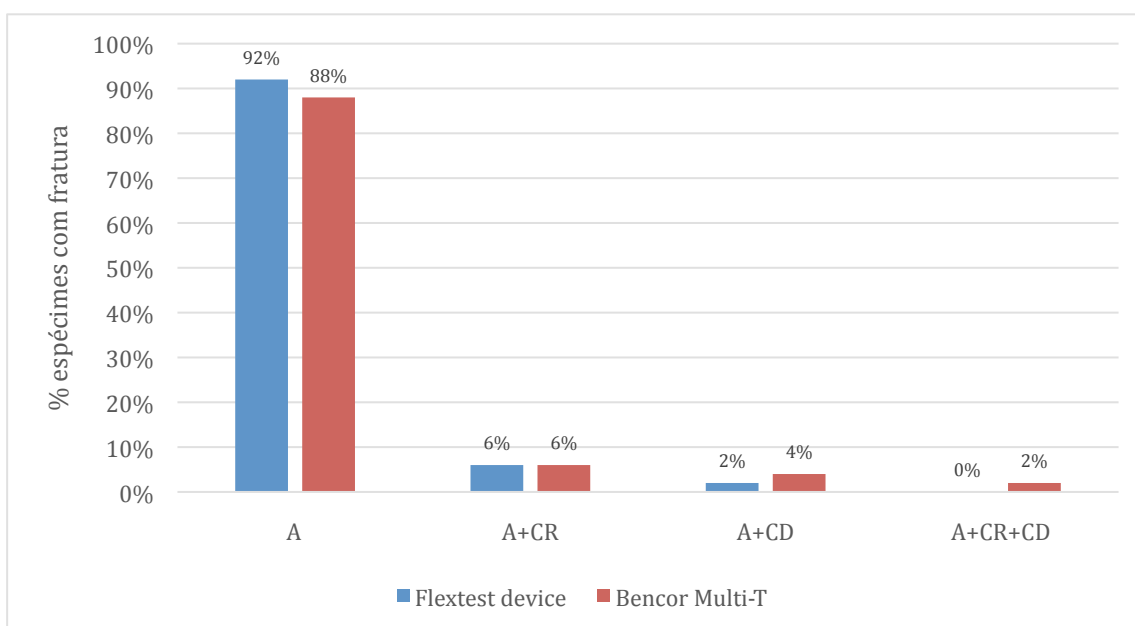


Figura 9 - % de espécimes de acordo com os diferentes tipos de fratura entre os dispositivos Flextest e Bencor Multi-T. A – fratura adesiva; CR – fratura coesiva em resina e CD – fratura coesiva em dentina.

5. Discussão

5. Discussão

O objetivo geral deste estudo foi desenvolver um dispositivo para ensaios mecânicos de RMT e RMC. Fatores relacionados à estrutura dentária, aos materiais restauradores, ao preparo dos espécimes e ao dispositivo e equipamento utilizados para os ensaios mecânicos são capazes de influenciar nos resultados dos estudos (102,106,137,138). Até o momento, não existe um consenso ou protocolo estabelecido que considere ideal um dispositivo para ensaios mecânicos. Algumas evidências apontam que os diversos dispositivos de ensaios mecânicos disponíveis podem apresentar uma diferença significativa quanto às suas performances (106,107). Neste contexto, o dispositivo Flextest foi desenvolvido com o propósito de possibilitar uma distribuição mais uniforme das forças de tração aplicadas aos espécimes e, secundariamente, servir para outras modalidades de ensaios mecânicos. Dessa forma, o objetivo foi atingido.

A validação do dispositivo Flextest foi realizada por meio de um ensaio de microtração para avaliar a resistência adesiva tendo como controle a utilização do dispositivo Bencor Multi-T, o qual apresenta uma boa aceitação na literatura. Com relação à estrutura física do dispositivo Flextest, os dois trilhos que guiam a mesa deslizante permitem um correto alinhamento e movimentação da mesa, fato que evita flexões dos espécimes testados e permite a aplicação de uma carga de tração pura ao espécime. O dispositivo ainda permite que o espécime, em formato de palito, seja fixado em um entalhe especialmente desenvolvido para seu formato. Uma placa metálica pode ser acoplada na face livre do espécime fixado para possibilitar uma distribuição ainda mais uniforme das forças aplicadas, o que está de acordo com o conceito de que um aumento do número de faces do espécime que estejam fixadas ao dispositivo melhoram a distribuição das forças de tração (138,139).

Apesar destas hipóteses não terem sido testadas no presente estudo, foi observada uma menor variação dos valores de microtração intra-grupo quando os espécimes foram testados no dispositivo Flextest. Estes resultados acenam favoravelmente para as hipóteses de que o dispositivo desenvolvido permite a

execução de ensaios de tração mais puros em comparação ao dispositivo Bencor.

Uma variação intra-grupo estatisticamente significativa foi observada para os dois dispositivos testados. Deve ser enfatizado o fato de que a variação intra-grupo observada no grupo Bencor Multi-T não invalida a confiança que deve ser creditada à performance deste dispositivo porque as variações podem decorrer de diferenças existentes nas estruturas dentárias testadas, tendo em vista que os dentes não foram provenientes de um mesmo paciente. Dessa mesma forma, a variação intra-grupo observada no grupo Flextest também não deve invalidar a confiança neste dispositivo.

Nenhuma diferença significativa foi observada quando comparados os valores inter-grupo entre os ensaios executados com os dois dispositivos. Esta evidência mostra que o dispositivo Flextest apresentou uma boa performance em ensaios de microtração de resistência adesiva. Ainda neste estudo, um menor desvio-padrão foi observado no grupo Flextest em comparação ao grupo Bencor Multi-T; no entanto, esta evidência não é unânime na literatura, tendo em vista que outros estudos que utilizaram o dispositivo Bencor Multi-T apresentaram valores de desvio-padrão similares ou até mesmo menores em comparação aos valores obtidos no grupo Flextest do presente estudo (101,135,136,140,141). Ainda assim, o fato do desvio-padrão obtido no grupo Flextest ter sido consideravelmente menor que aquele do grupo Bencor Multi-T, é um fato que merece destaque tendo em vista a incorporação de algumas características no desenvolvimento deste dispositivo que permitem com que exista a realização de um ensaio de tração mais preciso.

Muitos estudos já apresentaram valores de média de resistência adesiva por microtração (99,100,106,140,142). De acordo com os resultados, podemos considerar que ambos os dispositivos testados possibilitam a obtenção de valores de média de resistência adesiva razoáveis, tendo em vista que nenhum deles apresentou nem valores mais baixos nem mais altos que aqueles até hoje registrados na literatura.

De acordo com os tipos de fratura observados em estudos de microtração para avaliação da resistência adesiva, Raposo *et al.* (143)

mostraram que existe uma associação significativa entre o tipo de fratura obtida e o dispositivo de ensaios utilizado ($p < 0.0001$). Esta evidência não foi observada no estudo. Ambos os dispositivos apresentaram predominantemente fraturas adesivas, 88% e 92% para os grupos Bencor Multi-T e Flextest, respectivamente. Fraturas exclusivamente coesivas não foram observadas, fato que corrobora com a afirmação de que testes de microtração resultam em menos fraturas coesivas (143). Esta evidência provavelmente está relacionada ao fato de que a força coesiva da dentina e da resina composta são mais fortes que a força adesiva estabelecida entre elas. Modalidades mistas de fratura ocorreram de maneira similar em ambos os grupos.

Os resultados apresentados neste estudo de validação do dispositivo Flextest mostraram que este dispositivo pode ser utilizado para ensaios de microtração com uma observância de boa reprodutibilidade e similaridade ao dispositivo Bencor Multi-T. Apesar de terem sido incorporados recursos que permitem uma correta distribuição de forças de tração aplicadas com o intuito de evitar cargas mecânicas indesejáveis, os custos para sua confecção são baixos, o que torna o dispositivo competitivo neste mercado. Adicionalmente, as superfícies planas das bases de fixação dos espécimes, que permitem com que elas fiquem em íntimo contato, possibilitam a execução de ensaios de compressão.

O objetivo secundário do estudo foi comprovar que o dispositivo desenvolvido possibilitaria a realização de ensaios de RMT e RMC. De acordo com o estudo de resistência adesiva à microtração realizado, os ensaios de RMT puderam ser validados, mas os ensaios de compressão não o foram. Ainda assim, ao considerar que a diferença entre ensaios compressivos e de tração reside na orientação do deslocamento da mesa deslizante do dispositivo, infere-se que o dispositivo permita a execução de ensaios de compressão de maneira adequada.

PARTE 2

Propriedades mecânicas da dentina afetada por AI e DGI-II

6. Objetivos

6. Objetivos

6.1 Objetivo geral

Avaliar as propriedades mecânicas da dentina em dentes com hipótese diagnóstica de AI do tipo hipoplásico e hipomaturado e dentes afetados pela condição de DGI-II e compará-las separadamente, por apresentarem etiologias distintas, à dentina de dentes não-afetados (grupo controle) em ensaios mecânicos monotônicos de RMT e RMC. Avaliar histologicamente os tecidos afetados por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV).

6.2 Objetivos específicos

Testar as seguintes hipóteses:

- 1 – A resistência máxima à tração da dentina em dentes com hipótese diagnóstica de AI do tipo hipoplásico e hipomaturado é semelhante àquela dos dentes do grupo controle.
- 2 - A resistência máxima à compressão da dentina em dentes com hipótese diagnóstica de AI do tipo hipoplásico e hipomaturado é semelhante àquela dos dentes do grupo controle.
- 3 - A estrutura morfológica da dentina de dentes com hipótese diagnóstica de AI do tipo hipoplásico e hipomaturado não difere daquela dos dentes do grupo controle.
- 4 - A resistência máxima à tração da dentina em dentes afetados pela condição de DGI-II é inferior àquela dos dentes do grupo controle
- 5 - A resistência máxima à compressão da dentina em dentes afetados pela condição de DGI-II é inferior àquela dos dentes do grupo controle.
- 6 - A estrutura morfológica da dentina de dentes afetados pela condição de DGI-II difere daquela dos dentes do grupo controle.

7. Metodologia

7. Metodologia

O estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP), Ministério da Saúde – MS, no dia 13 de outubro de 2009, sob o protocolo de número 078/09.

7.1 Amostra

7.1.1 Seleção da Amostra

Após a validação do dispositivo, dezessete dentes foram utilizados para os ensaios mecânicos de RMT e RMC. Destes, seis dentes foram doados por pacientes não-afetados, grupo controle; cinco dentes foram doados por pacientes com hipótese diagnóstica clínica de AI do tipo hipoplásico e hipomaturado e seis dentes por pacientes com diagnóstico clínico de DGI-II, grupos teste.

Os dentes do grupo AI foram provenientes de duas pacientes pertencentes a uma mesma família, com um grau de parentesco por consanguinidade em segundo grau. Os dentes do grupo DGI-II eram também provenientes de duas pacientes pertencentes a uma mesma família e com mesmo grau de parentesco.

As famílias dos indivíduos doadores são acompanhadas pelo centro de atendimento a pacientes portadores de anomalias dentárias, no Hospital Universitário de Brasília – HUB - e ambas possuem outros parentes afetados.

Os dentes para o estudo de validação do dispositivo e do grupo controle foram doados por pacientes não-afetados da livre demanda do centro cirúrgico da clínica odontológica do HUB, portadores de terceiros molares sem sinais clínicos de alterações na coloração coronária, sem hipoplasias e/ou opacidades, nem alterações sob aspecto radiográfico. Estes pacientes relataram não existirem parentes em suas famílias que apresentassem alterações clínicas de forma e coloração em suas dentições e também tiveram

suas necessidades de tratamento odontológico realizadas pelo pesquisador responsável.

O acesso aos resultados da pesquisa foi garantido a todos os participantes.

7.1.2 Preparo da amostra

Espécimes para a avaliação da RMT, RMC e microscopia eletrônica de varredura foram obtidos a partir de cada um dos dentes armazenados nos grupos controle, AI e DGI-II.

A partir dos dezessete dentes utilizados nos três grupos, foram confeccionados, para os ensaios de RMT em dentina, 57 espécimes provenientes de 6 dentes do grupo controle, 45 de 5 dentes do grupo AI e 46 de 6 dentes do grupo DGI-II. Adicionalmente, para os ensaios de RMC em dentina, foram obtidos 20 espécimes provenientes dos mesmos 6 dentes do grupo controle, 18 dos dentes do grupo AI e 20 dos dentes do grupo DGI-II. Os espécimes para os ensaios de RMT e RMC apresentavam formato de palito. Cada dente do grupo controle, AI e DGI-II forneceu uma fatia para análise em microscopia eletrônica de varredura e outra fatia para a realização de ensaios de microdureza. Estes últimos ensaios fizeram parte da dissertação de mestrado da Dra. Raquel Lana Passos.

Uma peça de latão foi especialmente confeccionada para auxiliar o corte dos dentes e o conseqüente preparo dos espécimes. Este aparato apresenta dois braços com angulação de 90° entre os mesmos e orifício circular na área central para fixação do dente (Fig. 10).



Figura 10 - Aparato de latão para fixação dos dentes à mesa auxiliar da máquina de cortes.

A porção radicular de cada dente foi fixada com godiva bastão (Godiva Exata, DFL, Rio de Janeiro-Brasil) dentro do orifício do aparato de latão de forma a permitir que a porção coronária ficasse totalmente exposta. Este conjunto foi montado em mesa auxiliar da máquina de cortes Secotom (Struers, Ballerup-Dinamarca), pertencente ao Laboratório de Materiais do Departamento de Engenharia Mecânica da UnB. Os cortes foram realizados em sentido vestibulo-lingual, de forma a atravessar toda a espessura do dente, com início dos mesmos sempre na face mesial. Após o primeiro corte, a mesa auxiliar era movida 1,4mm lateralmente para o corte seguinte e assim sucessivamente até o limite distal do dente. Como a espessura do disco de corte é de aproximadamente 0,5mm, a movimentação de 1,4mm permitiu que as fatias originadas tivessem aproximadamente 0,9mm em espessura. As fatias com presença exclusiva de esmalte, mais periféricas, foram descartadas.

As primeiras fatias mesiais com presença de dentina, de cada dente, foram removidas da base radicular com o auxílio de pontas diamantadas extra-finas montadas em alta rotação e sob refrigeração constante, sendo imediatamente acondicionadas em frascos individuais com solução fisiológica de Thymol a 0,1%. Estes espécimes foram submetidos à realização da avaliação em microscopia eletrônica de varredura.

Após a obtenção da fatia para microscopia, o aparato de latão com o remanescente dentário fatiado era girado em 90° e os cortes, agora em sentido mesio-distal, foram executados também de forma a atravessar toda a espessura do dente. Após a finalização dos cortes, os espécimes, em formato de palito, foram separados do remanescente dentário radicular com o auxílio de pontas diamantadas extra-finas montadas em alta rotação e sob refrigeração constante. Os espécimes foram imediatamente acondicionados em frascos individuais preenchidos com água destilada e identificados quanto à região do dente da qual foram obtidos (vestibular, lingual e distal). Os espécimes para os ensaios de RMT foram obtidos destas regiões periféricas dos dentes porque a presença da câmara pulpar não permitira a obtenção de espécimes mais compridos, condição necessária para a execução dos ensaios de RMT. A

seção transversal dos espécimes era de aproximadamente $0,8\text{mm}^2$ e comprimento de aproximadamente 7mm ($0,9 \times 0,9 \times 7\text{mm}$). A mensuração das dimensões da seção transversal dos espécimes foi realizada com paquímetro digital (Pantec, Panambra Zwick, São Paulo-Brasil).

Os espécimes obtidos da região oclusal, menores em comprimento em virtude presença da câmara pulpar, foram destinados para os ensaios de RMC. O esmalte da região oclusal destes espécimes foi removido e a porção dentinária interna regularizada por desgaste em lixa d'água 600 (Norton/Saint-Gobain, Brasil). Os espécimes para os ensaios de RMC apresentaram comprimento de aproximadamente 2mm e seção transversal de $0,8\text{mm}^2$ ($0,9 \times 0,9 \times 2\text{mm}$) (Figs. 11 e 12).

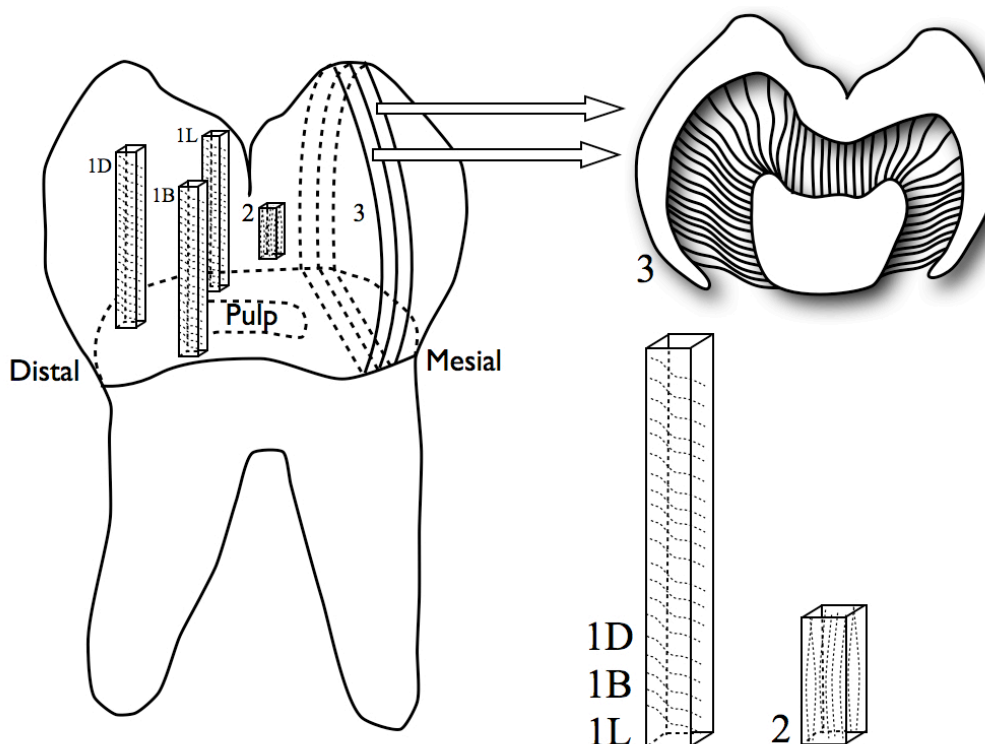


Figura 11 – Localização espacial das regiões dentárias que forneceram espécimes para os ensaios de RMT (1D – distal, 1L – lingual, 1B – vestibular), maior comprimento e de região periférica, e de RMC (2), menor comprimento e área mais central. Fatia utilizada para análise em microscopia eletrônica de varredura (3).

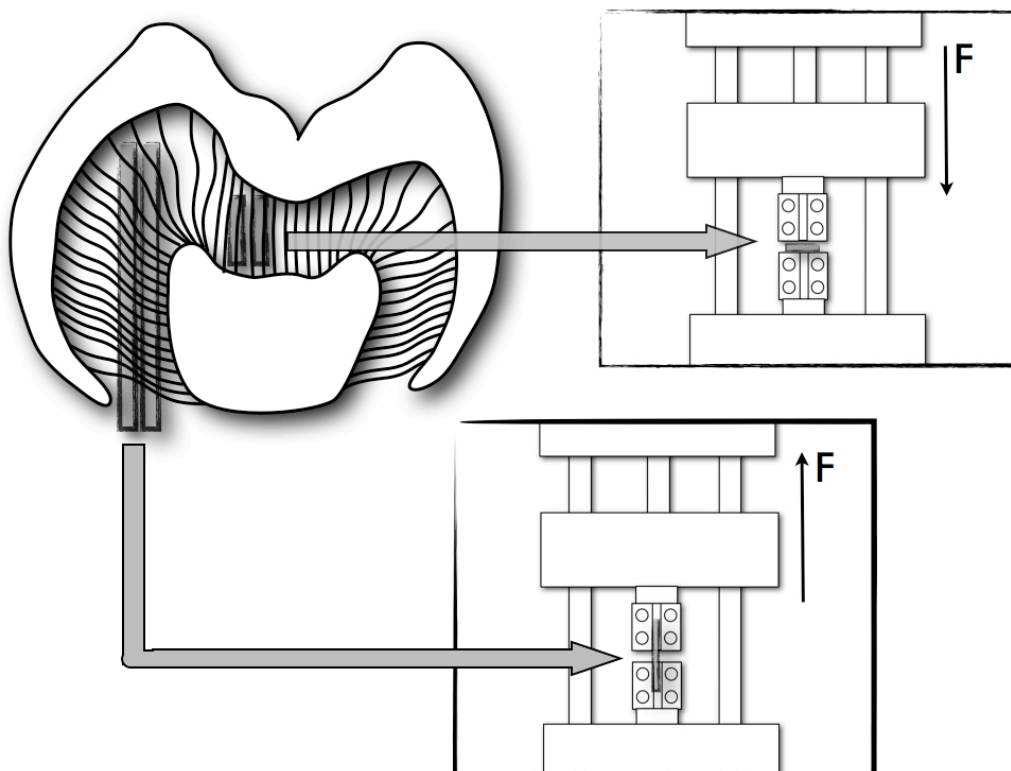


Figura 12 – Espécimes de maior comprimento foram destinados aos ensaios de RMT e os de menor comprimento aos ensaios de RMC.

Os espécimes foram testados imediatamente após a sua separação do remanescente radicular, sendo necessário o armazenamento em frascos individuais com água destilada para fins de identificação e transporte entre o laboratório do preparo dos espécimes e aquele no qual os ensaios mecânicos foram realizados.

7.2 Equipamentos

Os ensaios de RMT e RMC foram realizados na máquina MTS (MTS Systems Corporation, Minnesota-EUA), com a utilização de uma célula de carga SV 100 (ALFA instrumentos, São Paulo-Brasil), com capacidade nominal de 100Kg.

7.3 Ensaio de resistência máxima à tração

Após a validação do dispositivo Flextest, os ensaios para avaliar a RMT do tecido dentinário dos grupos DGI-II e AI foram executados.

Os espécimes foram fixados no dispositivo Flextest com adesivo à base de éster de cianoacrilato, Superbonder gel (Loctite, Henkel, Alemanha), após aplicação prévia do acelerador 7452 (Loctite, Henkel, Alemanha) na superfície de colagem (Fig. 13).

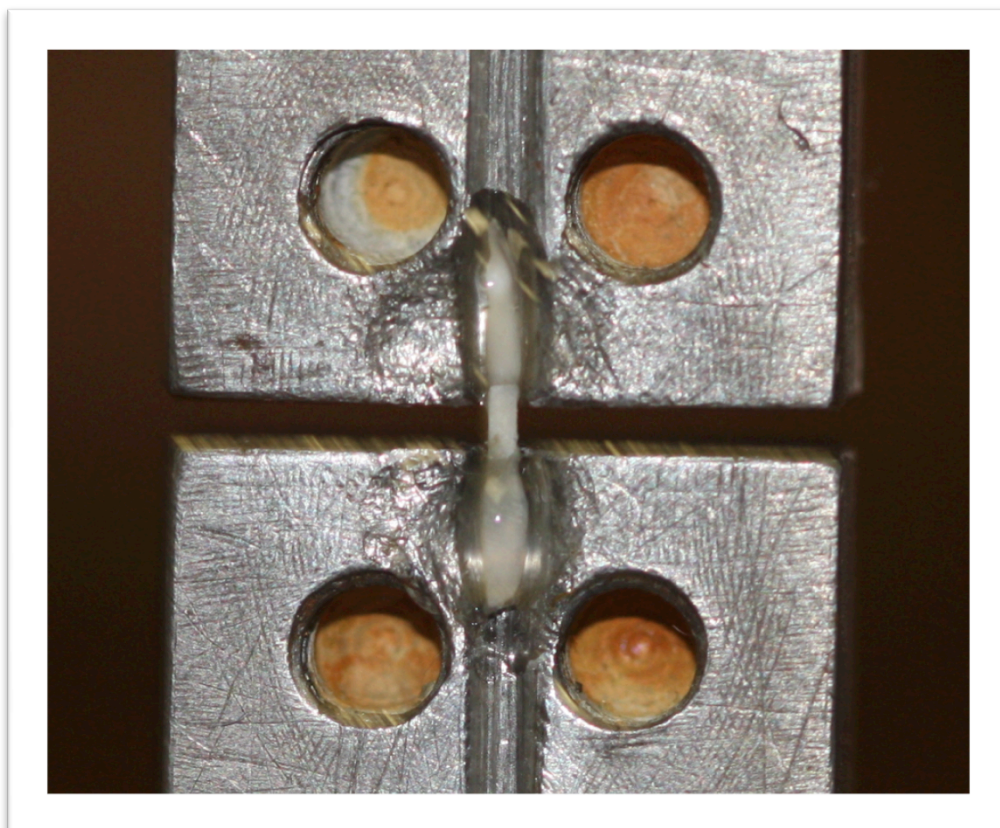


Figura 13 - Espécime preparado para o ensaio de RMT colado ao dispositivo

Após a presa completa do adesivo, a placa metálica era fixada sobre o espécime com o auxílio dos quatro parafusos de fixação e a máquina MTS era acionada, em controle de deslocamento, a uma velocidade de 1,0 mm/min até o momento de fratura do espécime.

Após a fratura, o ensaio era interrompido, as placas metálicas removidas e as duas partes do espécime fraturado eram armazenadas em água destilada.

A superfície do dispositivo recebia uma limpeza com auxílio de um solvente a base de acetona antes do posicionamento de um novo espécime.

7.4 Ensaios de resistência máxima à compressão

Os ensaios de RMC também foram executados com o auxílio do dispositivo Flextest. A carga foi aplicada uniaxialmente, com orientação perpendicular ao longo eixo dos espécimes e, conseqüentemente, perpendicular à orientação dos túbulos dentinários, tendo em vista que os espécimes foram obtidos da área centro-oclusal do dente, cuja orientação dos túbulos está mais paralela ao seu longo eixo. Os espécimes foram posicionados sobre a superfície plana da base acoplada à mesa fixa sem auxílio de adesivo (Fig. 14). O posicionamento foi realizado dessa forma para que fosse evitada a flambagem do espécime.

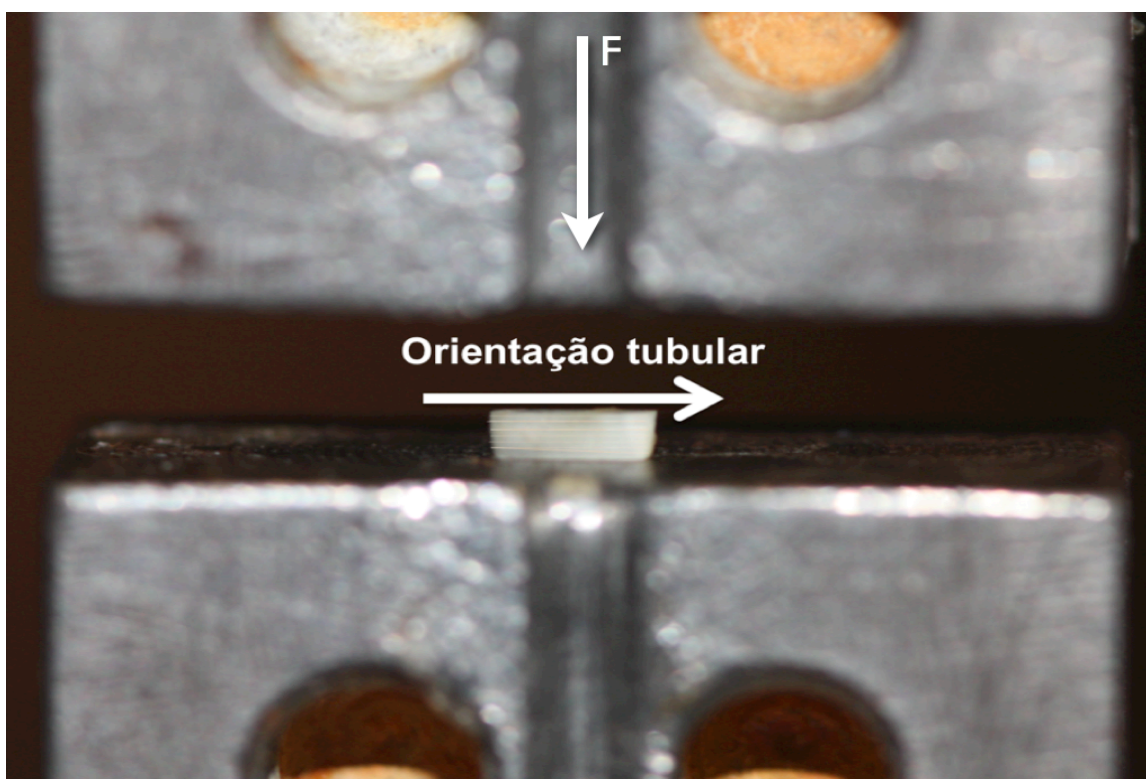


Figura 14 - Espécime posicionado para o ensaio de RMC apoiado sobre a base acoplada à mesa fixa do dispositivo. Ilustração representativa da orientação dos túbulos dentinários dos espécimes submetidos aos ensaios de RMC.

A máquina de ensaios era acionada, em controle de deslocamento prescrito, a uma velocidade de 1mm/min e a mesa móvel realizava a compressão do espécime sobre a mesa fixa do dispositivo até o momento de fratura.

Ocorrida a fratura, o ensaio era interrompido e as bases do dispositivo eram afastadas para limpeza da área de teste. Os espécimes fraturados foram descartados em virtude do esfacelamento dos mesmos.

A verificação do valor máximo de RMT e RMC era feita pelo monitoramento do sistema de aquisição de dados MTS Test Star-II (MTS Systems Corporation, Minnesota-EUA). Os valores de força registrados, em N, foram transformados para tensão média, em MPa, da seguinte maneira: N foram convertidos para Kgf ($9,8 \text{ N} \cong 1 \text{ Kgf}$) e, este último, foi dividido pela área da seção transversal do espécime em centímetros quadrados (cm^2).

7.5 Análise estatística

As variáveis de RMT e RMC em dentina foram avaliadas quanto ao padrão de distribuição de frequências por meio do teste de normalidade de Lilliefors. Além disso, quando tais variáveis foram avaliadas entre os dentes do grupo controle e grupo amelogênese imperfeita (AI), assim como entre o grupo controle e o grupo dentinogênese imperfeita (DGI), utilizou-se o teste de Bartlett para análise da homogeneidade das variâncias. Uma vez que tais dados encontravam-se em normalidade e em homogeneidade, as comparações intra-grupo e inter-grupo foram realizadas por meio de testes paramétricos. Todas as análises apresentaram um nível de significância de 0.05. Foram realizadas as seguintes análises com os respectivos testes de hipótese:

1) Avaliação da RMT entre os dentes e entre os grupos. Intra-grupo: Análise da Variância (ANOVA) com fator único; Inter-grupo: teste t para amostras independentes.

2) Avaliação da RMT sobre as áreas de origem dos espécimes dos dentes entre os grupos. Intra-grupo: ANOVA fator único; Inter-grupo em cada face: teste t para amostras independentes.

3) Avaliação da RMC entre os dentes e entre os grupos. Intra-grupo: ANOVA fator único; Inter-grupo: teste t para amostras independentes.

7.6 Etapa histológica

7.6.1 Preparo dos espécimes para microscopia eletrônica de varredura

As fatias submetidas à avaliação da microscopia eletrônica de varredura foram polidas com lixas metalográficas com granulação decrescente de 400, 600, 1200, 1500 (Norton, Brasil), 2000 (3M ESPE, Brasil), 2400 e 4000 (Buehler, EUA), intercalando-se com banho de 30 segundos em ultrassom (Bransonic, EUA) com água destilada. Em seguida, foram descalcificadas com ácido fosfórico a 10% em agitação leve por 1 segundo e lavadas em água corrente por 2 minutos. A desidratação foi realizada com banhos de 10 minutos em concentrações crescentes de álcool (70, 80, 90, 95 e 100%) e colocadas em HMDS overnight.

7.6.2 Análise histológica

Os espécimes foram levados ao Laboratório de Biologia Celular do Instituto de Biologia da Universidade de Brasília onde foram levadas à secadora ao ponto crítico (CPD 030 - Critical Point Dryer, Balzers-Alemanha) e cobertos com ouro em evaporador (SCD 050 - Sputter Coater Deposition, Balzers-Alemanha).

As análises histológicas foram realizadas em Microscópio Eletrônico de Varredura (JEOL JSM 7001F, Jeol, Japão), equipamento também do

Laboratório de Biologia Celular do Instituto de Biologia da Universidade de Brasília.

As características morfológicas da dentina das fatias dentárias preparadas foram observadas em aumentos de 1000x, 2500x e 5000x. As fotografias destes aumentos foram realizadas e as características descritas e comparadas entre os grupos.

8. Resultados

8. Resultados

8.1 Grupo Amelogênese imperfeita

8.1.1 Caracterização fenotípica

As pacientes doadoras dos dentes para o grupo AI são naturais de Brasília, Distrito Federal, Brasil. Ambas as pacientes foram atendidas pela primeira vez na na Clínica de Anomalias Dentárias do HUB em 26 de julho de 2005 com hipótese diagnóstica de amelogênese imperfeita do tipo hipoplásico e hipomaturado. A paciente doadora dos dentes 1, 2 e 3 apresentava, à época da primeira consulta, a idade de 11 anos e, ao exame clínico, todos os dentes com opacidades difusas e pequenas áreas hipoplásicas; enquanto sua irmã, doadora dos dentes 4 e 5, tinha 14 anos quando foi realizada sua primeira consulta e clinicamente apresentou, além das opacidades difusas e hipoplasias generalizadas, opacidades acastanhadas nos dentes 31,41 e 42.

Nenhuma das duas pacientes apresentavam histórico de ingestão de flúor em excesso de acordo com o relato dos pais. A mãe das pacientes apresentava alterações dentárias semelhantes àquelas das filhas. Adicionalmente, existiram, por parte da mãe, relatos de que familiares apresentavam alterações dentárias semelhantes. A família dessas pacientes é acompanhada no centro de anomalias do desenvolvimento dentário do Hospital Universitário de Brasília desde esta época. As necessidades de tratamento odontológico e acompanhamento preventivo foram e continuam sendo realizados para todos os integrantes da família.

A paciente doadora dos dentes 1, 2 e 3 tinha dezessete anos quando os dentes foram extraídos enquanto sua irmã tinha vinte anos de idade quando os dentes 4 e 5 foram extraídos. Os procedimentos cirúrgicos de exodontia dos terceiros molares foram executados no ano de 2011. No exame radiográfico, nenhum dos dentes doados por estas pacientes apresentava alteração nos condutos radiculares ou câmara pulpar. À época das exodontias, ambas as pacientes apresentavam opacidades difusas e hipoplasias no esmalte, além de

atrições no terço oclusal/incisal de maneira generalizada em dentes anteriores e posteriores. Adicionalmente, a paciente doadora dos dentes 4 e 5 apresentava uma lesão periapical e uma cavitação coronária associadas ao dente 37.

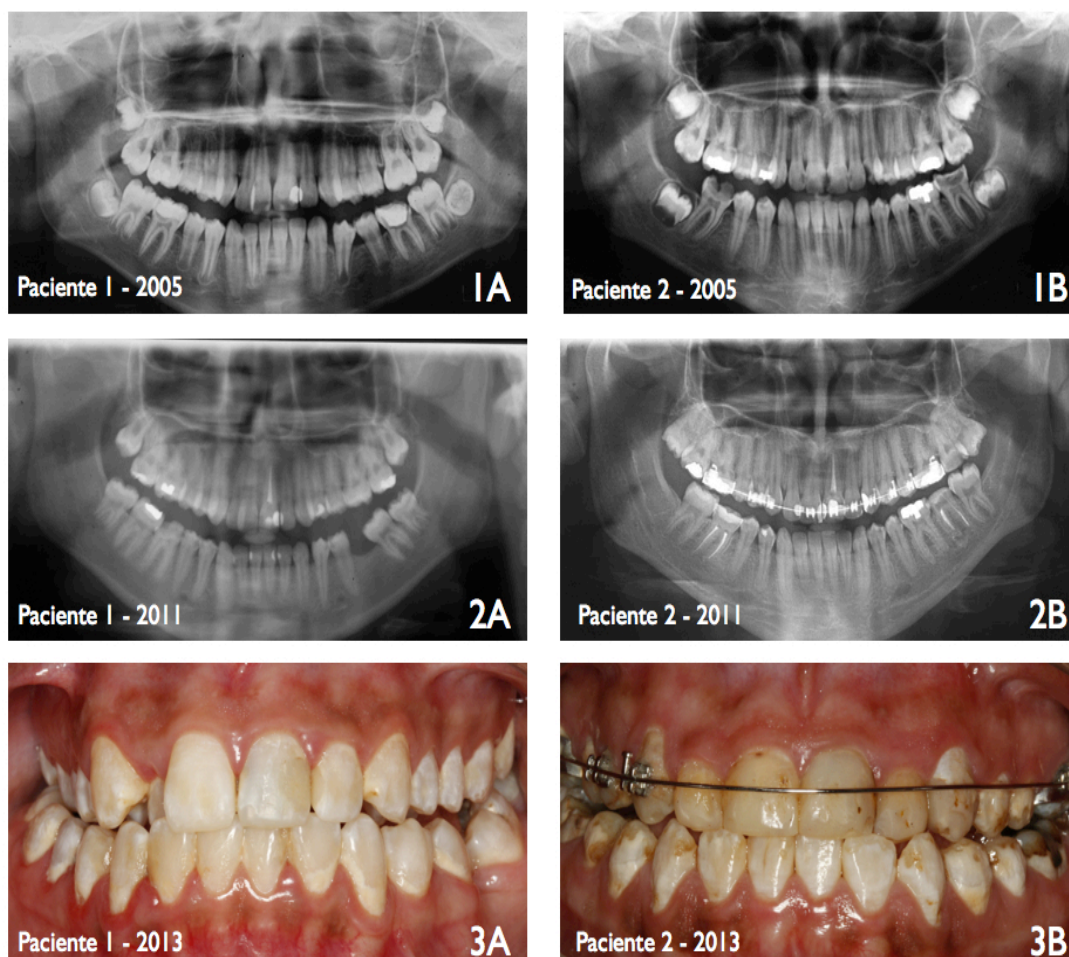


Figura 15 – 1A e 2A Radiografias panorâmicas da paciente doadora dos dentes 1,2 e 3 nos anos de 2005 e 2011, respectivamente. 3A Fotografia frontal da paciente 1 no ano de 2013 durante consulta de controle preventivo. 1B e 2B Radiografias panorâmicas da paciente doadora dos dentes 4 e 5 nos anos de 2005 e 2011, respectivamente. 3B Fotografia frontal da paciente 2 no ano de 2013 durante consulta de controle preventivo (Grupo AI).

8.1.2 Resistência máxima à tração

Na avaliação intra-grupo dos dentes com amelogenese imperfeita, os dentes 4 e 5 apresentaram médias significativamente mais elevadas

(91,01±14,84; 91,66±9,95, respectivamente) do que os demais ($p<0,05$) (Tab. 4 e Fig. 16).

Tabela 4 – Estatísticas descritivas (n, média e desvio padrão) e intervalos de confiança da RMT, em MPa, dos dentes dos grupos controle e amelogenese imperfeita (AI). P-valor do teste de Análise da Variância (ANOVA) em avaliação intra-grupo*.

Grupos	Dentes	n	Média	Desvio Padrão	IC -95%	IC +95%	p
CONTROLE	D1	11	99,70	17,38	88,03	111,38	$p>0,05$
	D2	10	96,54	23,27	79,90	113,19	
	D3	9	96,00	12,46	86,43	105,58	
	D4	8	92,17	9,49	84,24	100,10	
	D5	11	99,41	19,33	86,43	112,40	
	D6	8	87,50	13,03	76,60	98,39	
AI	D1	11	85,53	10,28	78,62	92,43	$p<0,05$
	D2	11	75,15	13,55 ^{b, c}	66,05	84,25	
	D3	7	79,22	17,05	63,45	94,99	
	D4	8	91,01	14,84 ^a	78,60	103,41	
	D5	8	91,66	9,95 ^a	83,34	99,97	

* As comparações são realizadas intra-grupo, ou seja, apenas entre os dentes de cada uma dos grupos em análise (Controle e AI).

^a ANOVA - LSD; $p<0,05$ = diferença entre as médias estatisticamente significativas com os espécimes do Dente 2

^b ANOVA - LSD; $p<0,05$ = diferença entre as médias estatisticamente significativas com os espécimes do Dente 4

^c ANOVA - LSD; $p<0,05$ = diferença entre as médias estatisticamente significativas com os espécimes do Dente 5

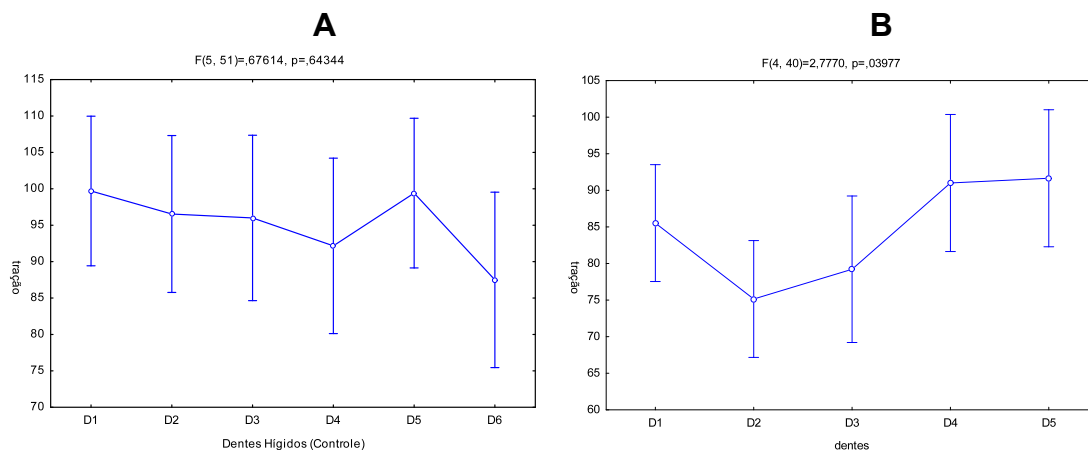


Figura 16 – Comparação intra-grupo das médias e intervalos de confiança da RMT, em MPa, dos espécimes dos dentes dos grupos A) Controle e B) Amelogenese imperfeita (AI).

Ao realizar a comparação inter-grupos, verificou-se que os grupos apresentaram diferenças estatisticamente diferentes entre si ($p<0,05$), sendo que os dentes hígidos do grupo controle apresentaram valores de RMT

significativamente mais elevados ($95,74 \pm 16,72$) que os valores do grupo amelogênese imperfeita ($84,07 \pm 14,13$) (Tab. 5 e Fig. 17)

Tabela 5 – Estatísticas descritivas (n, média e desvio padrão) e intervalos de confiança da RMT, em MPa, dos dentes dos grupos controle e amelogênese imperfeita (AI). P-valor do teste t para amostras independentes para avaliação inter-grupo*.

Grupos	n	Média	Desvio Padrão	IC -95%	IC +95%	p
CONTROLE	57	95,74 ^b	16,72	91,30	100,17	p<0,05
AI	45	84,07 ^a	14,13	79,83	88,32	

* As comparações são realizadas inter-grupo, ou seja, entre os grupos em análise (Controle e AI). $t=3,74$, $p\text{-valor}=0,000$.

^a teste t; $p<0,05$ = diferença entre as médias estatisticamente significativas com os dentes do Grupo Controle

^b teste t; $p<0,05$ = diferença entre as médias estatisticamente significativas com os dentes do Grupo AI

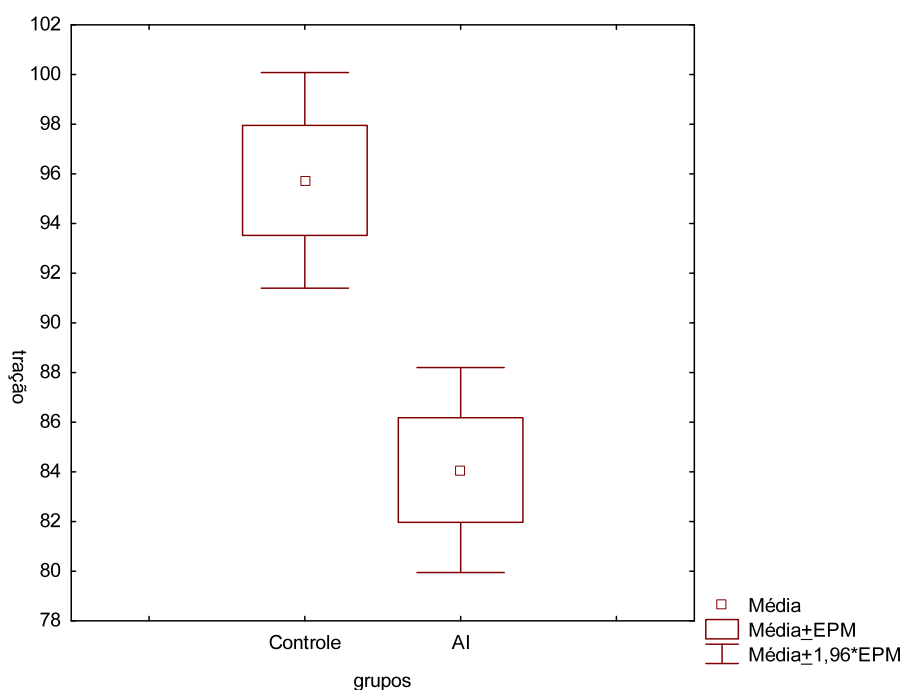


Figura 17 – Comparação inter-grupo das médias e intervalos de confiança da RMT, em MPa, os dentes dos grupos controle e amelogênese imperfeita (AI).

Na avaliação intra-grupo, foi possível verificar que a área de origem dos espécimes para os ensaios de RMT não resultou em diferenças

estatisticamente significantes, ou seja, apresentaram o mesmo comportamento médio de RMT nos dois grupos avaliados (Tab. 6 e Fig. 18).

Tabela 6 – Estatísticas descritivas (n, média e desvio padrão) e intervalos de confiança da RMT, em MPa, relacionada às faces dentárias a partir das quais foram obtidos os espécimes dos dentes dos grupos controle e amelogênese imperfeita (AI). P-valor do teste de Análise da Variância (ANOVA) em avaliação intra-grupo*.

Grupos	Faces	N	Média	Desvio Padrão	IC -95%	IC +95%	p
Controle	Vestibular	18	95,52	18,26	86,44	104,60	> 0,05
	Distal	18	98,90	18,94	89,48	108,32	
	Palatina	18	93,13	13,73	86,31	99,96	
AI	Vestibular	14	84,35	13,48	76,57	92,14	> 0,05
	Distal	16	84,81	16,14	76,21	93,42	
	Palatina	15	83,03	13,31	75,66	90,40	

* As comparações são realizadas intra-grupo, ou seja, apenas entre os dentes de cada uma dos grupos em análise (Controle e AI).

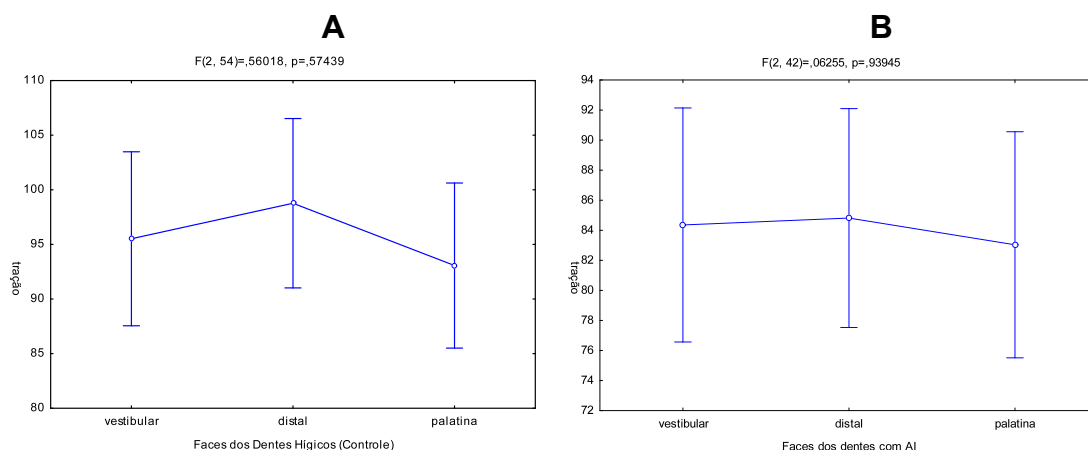


Figura 18 – Comparação intra-grupo das médias e intervalos de confiança da RMT, em MPa, relacionada às faces a partir das quais foram obtidos os espécimes dos grupos A) controle e B) amelogênese imperfeita - AI.

Contudo, ao realizar a avaliação inter-grupo, verificou-se que as faces distal e palatina do grupo de dentes com amelogênese imperfeita apresentaram médias significativamente mais baixas do que as respectivas faces dos dentes do grupo Controle ($p < 0,05$). Na face vestibular, as médias de RMT dos grupos controle e amelogênese imperfeita foram consideradas estatisticamente equivalentes, apesar da tendência à significância estatística ($p < 0,1$) (Tab. 7).

Tabela 7 – Estatísticas descritivas (n, média e desvio padrão) e intervalos de confiança da RMT, em MPa, relacionada às faces dentárias a partir das quais foram obtidos os espécimes dos dentes dos grupos controle e amelogênese imperfeita (AI). P-valor do teste t para amostras independentes para avaliação inter-grupo*.

Faces	Grupos	n	Média	Desvio Padrão	IC -95%	IC +95%	p
Vestibular	Controle	18	95,52	18,26	86,44	104,60	0,065
	AI	14	84,35	13,48	76,57	92,14	
Distal	Controle	18	98,90 ^b	18,94	89,48	108,32	< 0,05
	AI	14	84,81 ^a	16,14	76,21	93,42	
Palatina	Controle	18	93,13 ^b	13,73	86,31	99,96	< 0,05
	AI	14	83,03 ^a	13,31	75,66	90,40	

* As comparações são realizadas inter-grupo, ou seja, entre os grupos em análise (Controle e AI). Vestibular: $t=1,91$, $p\text{-valor}=0,065$; Distal: $t=2,36$, $p\text{-valor}=0,024$; Palatina: $t=2,17$, $p\text{-valor}=0,037$.

^a teste t; $p<0,05$ = diferença entre as médias estatisticamente significativas com os dentes do Grupo Controle

^b teste t; $p<0,05$ = diferença entre as médias estatisticamente significativas com os dentes do Grupo AI

8.1.3 Resistência máxima à compressão

Em relação à RMC, foi possível verificar na avaliação intra-grupo que os dentes foram semelhantes entre si em cada um dos grupos analisados ($p>0,05$). Sendo assim, é possível afirmar que os dentes apresentaram comportamentos semelhantes de acordo com o grupo ao qual fizeram parte (Tab. 8 e Fig. 19).

Na avaliação inter-grupo, verificou-se que os dentes do grupo controle e os dentes com amelogênese imperfeita apresentaram médias equivalentes entre si ($221,28\pm 48,69$ e $210,03\pm 31,57$, respectivamente) ($p>0,05$) (Tab. 9 e Fig. 20).

Tabela 8 – Estatísticas descritivas (n, média e desvio padrão) e intervalos de confiança da RMC, em MPa, dos dentes dos grupos controle e amelogenese imperfeita (AI). P-valor do teste de Análise da Variância (ANOVA) em avaliação intra-grupo*.

Grupo	Dentes	N	Média	Desvio Padrão	IC -95%	IC +95%	p
Controle	D1	4	221,05	90,18	77,55	364,55	p>0,05
	D2	4	227,00	31,69	176,57	277,43	
	D3	4	206,46	16,24	180,61	232,30	
	D4	3	194,51	71,48	16,95	372,07	
	D5	2	258,69	4,62	217,14	300,24	
	D6	3	235,53	3,77	226,17	244,88	
AI	D1	3	185,82	28,55	114,89	256,75	p>0,05
	D2	5	232,26	33,57	190,58	273,95	
	D3	2	204,72	28,21	-48,77	458,21	
	D4	4	191,88	21,74	157,29	226,47	
	D5	4	221,22	28,81	175,38	267,06	

* As comparações são realizadas intra-grupo, ou seja, apenas entre os dentes de cada uma dos grupos em análise (Controle e AI).

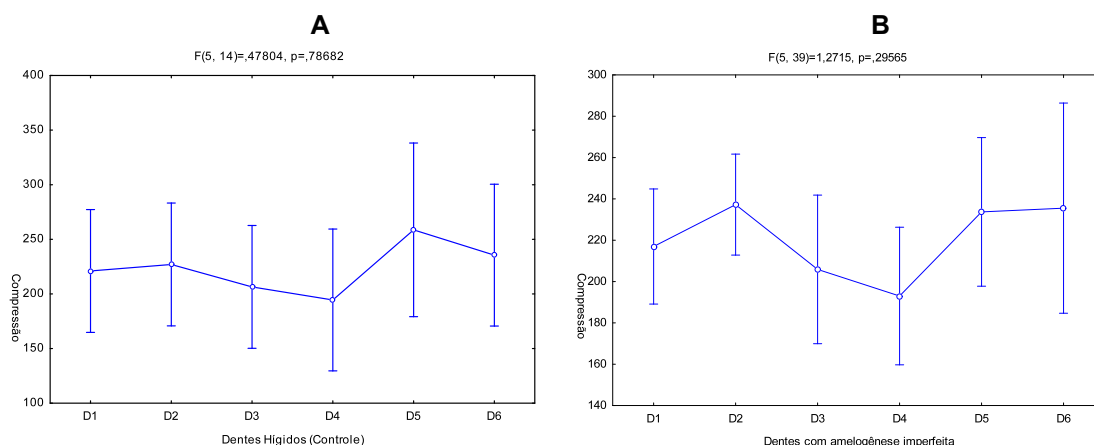


Figura 19 – Comparação intra-grupo das médias e intervalos de confiança da RMC, em MPa, dos espécimes dos dentes dos grupos A) controle e B) amelogenese imperfeita (AI).

Tabela 9 – Estatísticas descritivas (n, média e desvio padrão) e intervalos de confiança da RMC, em MPa, dos dentes dos grupos controle e amelogenese imperfeita (AI). P-valor do teste de t para amostras independentes em avaliação inter-grupo*.

Grupos	n	Média	Desvio Padrão	IC -95%	IC +95%	p
Controle	20	221,28	48,69	198,49	244,06	>0,05
AI	18	210,03	31,57	194,33	225,74	

* As comparações são realizadas inter-grupo, ou seja, entre os grupos em análise (Controle e AI). $t=0,83$, $p\text{-valor}=0,834$.

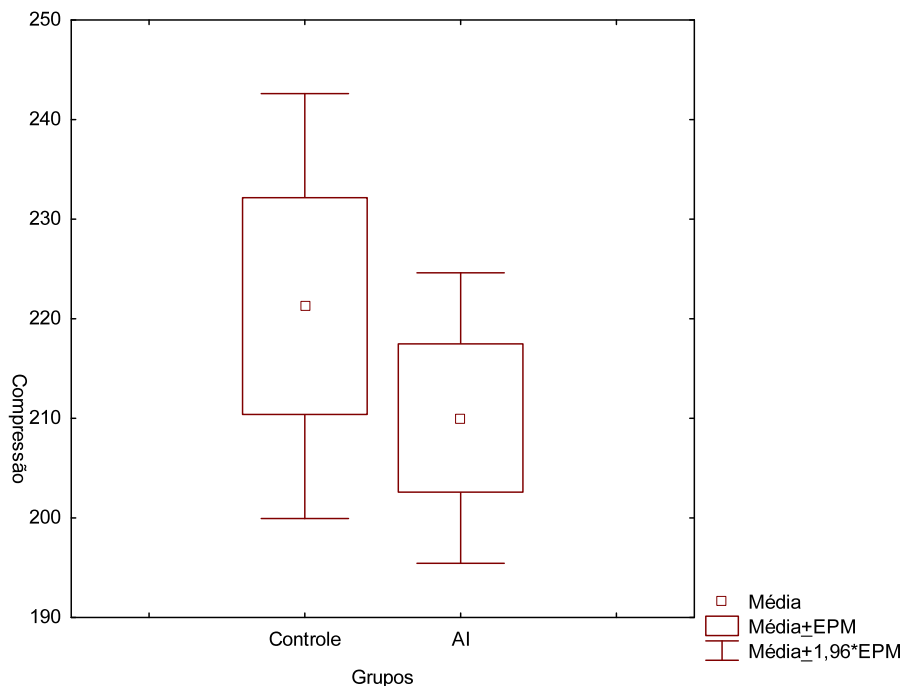


Figura 20 – Comparação inter-grupo das médias e intervalos de confiança da RMC, em MPa, dos dentes dos grupos controle e amelogenese imperfeita (AI).

8.1.4 Análise microestrutural

A análise dos espécimes do grupo controle, em MEV, revelou uma dentina com túbulos dentinários e dentina intertubular com aspectos de normalidade. Em alguns cortes, os túbulos dentinários apresentaram disposição oblíqua, em virtude da área coronária a partir da qual os espécimes foram obtidos, região mais mesial dos dentes. Os túbulos dentinários visualizados encontram-se com mesma orientação, distribuição e diâmetros homogêneos. Estas características morfológicas foram igualmente observadas nos diferentes aumentos executados, x1.000, x2.500 e x5.000 e nenhum padrão diferente da normalidade foi observado nos espécimes do grupo AI (Fig. 21).

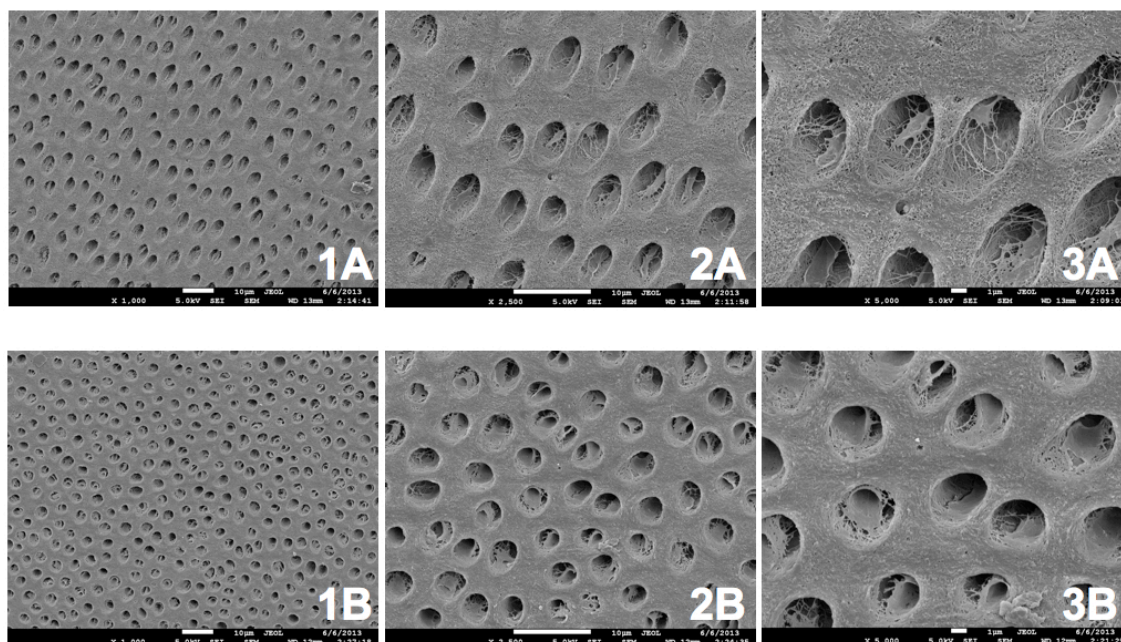


Figura 21 - 1A, 2A, 3A Corte oblíquo da dentina de dente afetado por AI em aumentos de 1.000x, 2.500x e 5.000x, respectivamente. 1B, 2B, 3B Corte transversal da dentina de dente não-afetado, controle, em aumentos de 1.000x, 2.500x e 5.000x, respectivamente.

8.2 Grupo Dentinogênese imperfeita

8.2.1 Caracterização fenotípica

As pacientes doadoras dos dentes para o grupo DGI são naturais de Ceilândia, Distrito Federal, Brasil. A paciente doadora dos dentes 1, 2 e 3, caso índice da família, foi inicialmente atendida em 17 de junho de 2003 na Clínica de Anomalias Dentárias do HUB com queixa principal de alteração da coloração dentária. A paciente tinha, nesta época, 6 anos de idade. Ao exame clínico, início da fase de dentição mista, os dentes permanentes e decíduos apresentavam-se com coloração amarronzada e acinzentada. Alterações dentárias semelhantes foram relatadas pela mãe da paciente, avó, tio, tia e primos. Os dentes decíduos apresentavam atrição ou fratura não acidental, resultando em altura oclusal reduzida na dentição mista. Ao exame

radiográfico, foi evidenciada uma obliteração dos canais radiculares e câmaras pulpares, bem como presença de coroas bulbosas e com constrição cervical.

A paciente doadora dos dentes 4, 5 e 6 foi inicialmente atendida em 31 de julho de 2003 com alteração da coloração coronária de toda a dentição permanente. A paciente tinha 10 anos de idade quando foi examinada pela primeira vez e seus dentes também apresentavam coloração amarronzada ou acinzentada, mas não apresentavam sinais clínicos de desgaste ou perda estrutural. A paciente já possuía toda a dentição permanente na época do exame inicial. De maneira semelhante à sua irmã, foi verificada uma obliteração dos canais radiculares e câmaras pulpares, bem como constrição cervical e coroas bulbosas ao exame radiográfico.

Os procedimentos cirúrgicos de exodontia dos terceiros molares foram executados no ano de 2011. Clinicamente, os dentes doados pelas pacientes não apresentavam nenhum sinal de desgaste ou atrição, mas apresentavam obliteração parcial de condutos radiculares e câmaras pulpares ao exame radiográfico. De maneira semelhante ao grupo AI, a família das pacientes com DGI-II é acompanhada no centro de anomalias do desenvolvimento dentário do Hospital Universitário de Brasília desde a época das primeiras consultas das pacientes doadoras dos dentes para este estudo. As necessidades de tratamento odontológico e acompanhamento preventivo também foram e continuam sendo realizados para todos os integrantes desta família.

À época da realiação das exodontias, ambas as pacientes apresentavam clinicamente uma coloração dentária acinzentada em todos os dentes permanentes, bem como foi verificado um formato bulboso das coroas e, radiograficamente, um estreitamento ou obliteração completa de câmaras pulpares e condutos radiculares.

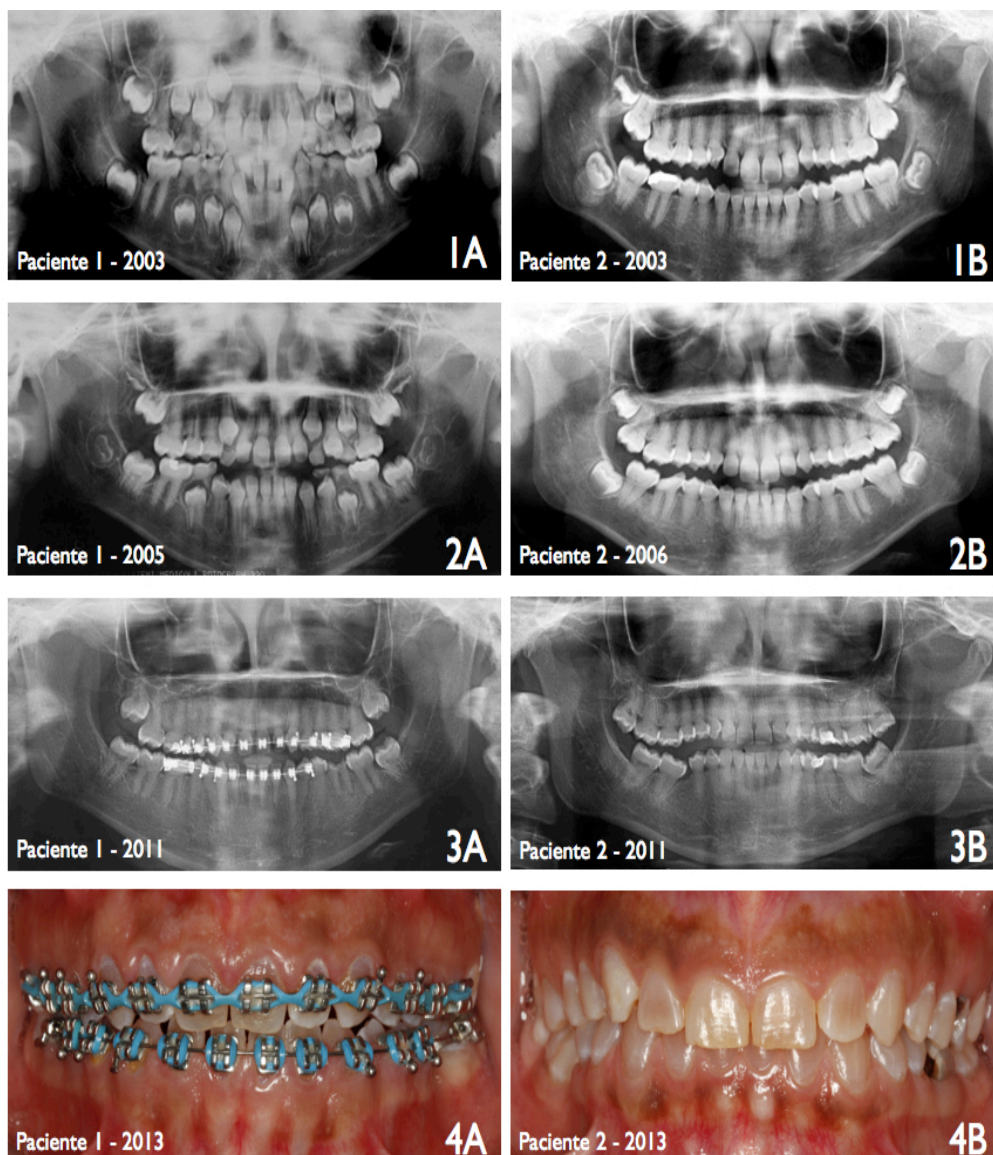


Figura 22 – 1A, 2A e 3A Radiografias panorâmicas da paciente doadora dos dentes 1, 2 e 3 nos anos de 2003, 2005 e 2011, respectivamente. 4A Fotografia frontal da paciente 1 no ano de 2013 durante consulta de controle preventivo. 1B, 2B e 3B Radiografias panorâmicas da paciente doadora dos dentes 4, 5 e 6 nos anos de 2003, 2006 e 2011, respectivamente. 4B Fotografia frontal da paciente 2 no ano de 2013 durante consulta de controle preventivo (Grupo DGI).

8.2.2 Resistência máxima à tração

Nesta análise, foi possível verificar que os dentes do grupo controle apresentaram o mesmo padrão médio de RMT, assim como os dentes do grupo dentinogênese imperfeita (Tab. 10 e Fig. 23).

Tabela 10 – Estatísticas descritivas (n, média e desvio padrão) e intervalos de confiança da RMT, em MPa, dos dentes dos grupos controle e dentinogênese imperfeita (DGI). P-valor do teste de Análise da Variância (ANOVA) em avaliação intra-grupo*.

Grupos	Dentes	n	Média	Desvio Padrão	IC -95%	IC +95%	p
CONTROLE	D1	11	99,70	17,38	88,03	111,38	p>0,05
	D2	10	96,54	23,27	79,90	113,19	
	D3	9	96,00	12,46	86,43	105,58	
	D4	8	92,17	9,49	84,24	100,10	
	D5	11	99,41	19,33	86,43	112,40	
	D6	8	87,50	13,03	76,60	98,39	
DGI	D1	8	63,22	12,48	52,78	73,65	p>0,05
	D2	7	69,60	12,88	57,69	81,51	
	D3	9	66,87	11,55	58,00	75,75	
	D4	7	74,31	11,28	63,88	84,74	
	D5	7	59,39	18,35	42,42	76,36	
	D6	8	73,01	25,12	52,01	94,01	

* As comparações são realizadas intra-grupo, ou seja, apenas entre os dentes de cada uma dos grupos em análise (Controle e DGI).

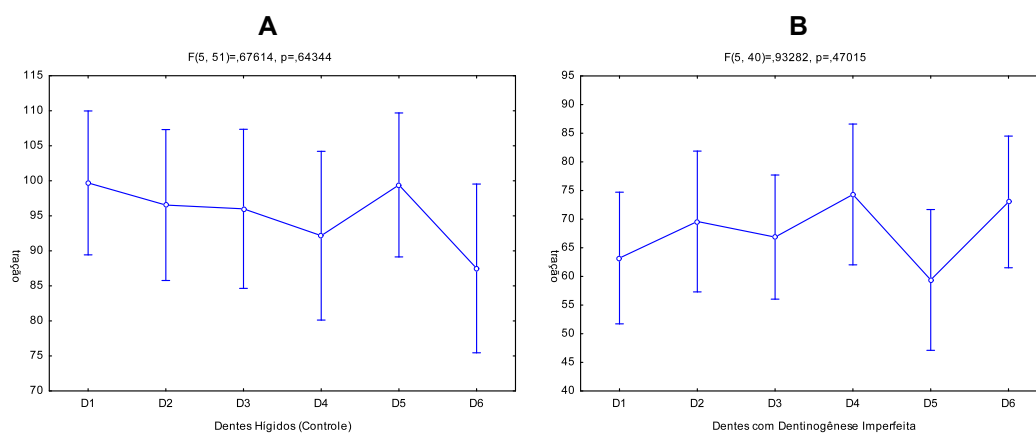


Figura 23 – Comparação intra-grupo das médias e intervalos de confiança da RMT, em MPa, dos espécimes dos dentes dos grupos A) Controle e B) Dentinogênese imperfeita (DGI).

Ao realizar a comparação inter-grupos, verificou-se que todos apresentaram diferenças estatisticamente diferentes entre si ($p < 0,05$), sendo que os dentes hígidos do grupo controle apresentaram valores de RMT significativamente mais elevados ($95,74 \pm 16,72$) do que os dentes com dentinogênese imperfeita ($67,71 \pm 16,03$) (Tab. 11 e Fig. 24).

Tabela 11 – Estatísticas descritivas (n, média e desvio padrão) e intervalos de confiança da RMT, em MPA, dos dentes dos grupos controle e dentinogênese imperfeita (DGI). P-valor do teste t para amostras independentes em avaliação inter-grupo*.

Grupos	n	Média	Desvio Padrão	IC -95%	IC +95%	p
CONTROLE	57	95,74 ^b	16,72	91,30	100,17	p<0,05
DGI	46	67,71 ^a	16,03	62,95	72,47	

* As comparações são realizadas inter-grupo, ou seja, entre os grupos em análise (Controle e DGI). $t=8,61$, $p\text{-valor}=0,000$.

^a teste t; $p<0,05$ = diferença entre as médias estatisticamente significativas com os dentes do Grupo Controle

^b teste t; $p<0,05$ = diferença entre as médias estatisticamente significativas com os dentes do Grupo DGI

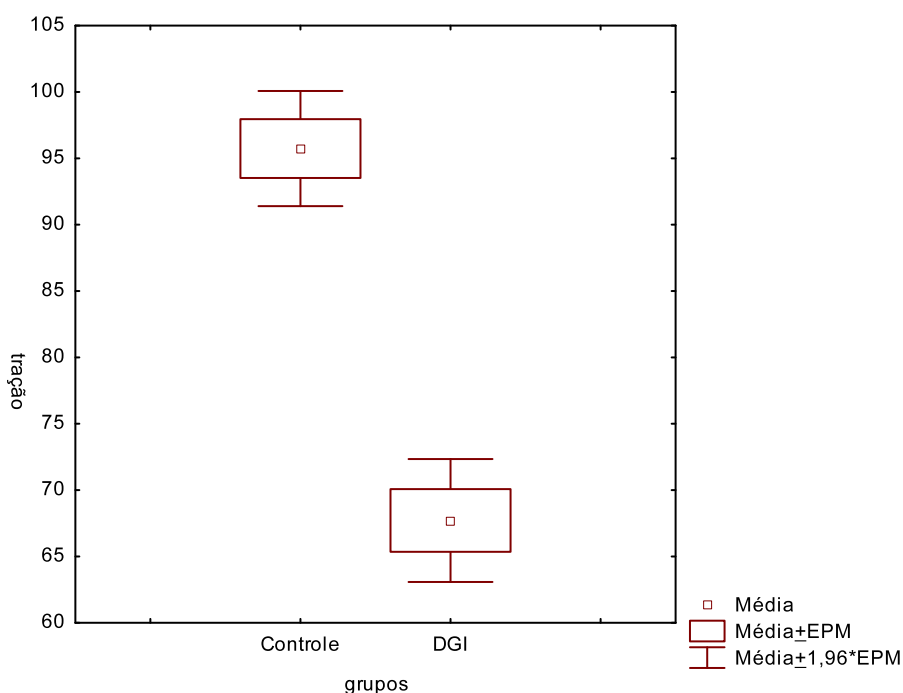


Figura 24 – Comparação inter-grupo das médias e intervalos de confiança da RMT, em MPa, dos dentes dos grupos controle e dentinogênese imperfeita (DGI).

Na avaliação intra-grupo, foi possível verificar que a área de origem dos espécimes para os ensaios de RMT não resultou em diferenças estatisticamente significativas. Os espécimes, independentemente da área de origem, apresentaram o mesmo comportamento médio de RMT nos dois grupos avaliados (Tab. 12 e Fig. 25).

Contudo, ao realizar a avaliação inter-grupo, verificou-se que as faces vestibular, distal e palatina do grupo de dentes com dentinogênese imperfeita apresentaram médias significativamente mais baixas do que os dentes do grupo controle ($p<0,05$) (Tab. 13).

Tabela 12 – Estatísticas descritivas (n, média e desvio padrão) e intervalos de confiança da RMT, em MPa, relacionada às faces dentárias a partir das quais foram obtidos os espécimes dos dentes dos grupos controle e dentinogênese imperfeita (DGI). P-valor do teste de Análise da Variância (ANOVA) em avaliação intra-grupo*.

Grupos	Faces	N	Média	Desvio Padrão	IC -95%	IC +95%	p
Controle	Vestibular	18	95,52	18,26	86,44	104,60	> 0,05
	Distal	18	98,90	18,94	89,48	108,32	
	Palatina	18	93,13	13,73	86,31	99,96	
DGI	Vestibular	13	69,63	12,98	61,78	77,47	> 0,05
	Distal	13	63,07	11,57	56,08	70,06	
	Palatina	13	65,70	17,65	55,03	76,37	

* As comparações são realizadas intra-grupo, ou seja, apenas entre os dentes de cada uma dos grupos em análise (Controle e DGI).

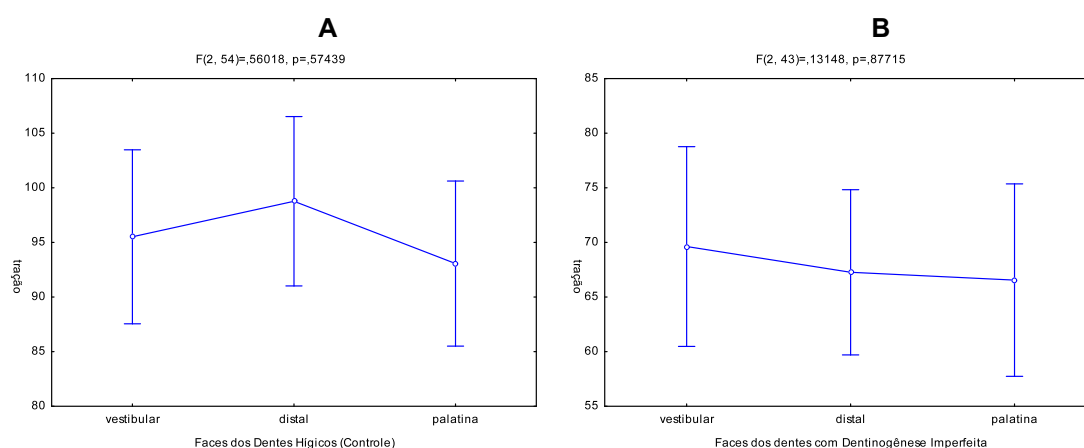


Figura 25 – Comparação intra-grupo das médias e intervalos de confiança da RMT, em MPa, relacionada às faces a partir das quais foram obtidos os espécimes dos grupos controle e dentinogênese imperfeita (DGI).

Tabela 13 – Estatísticas descritivas (n, média e desvio padrão) e intervalos de confiança da RMT, em MPa, relacionada às faces dentárias a partir das quais foram obtidos os espécimes dos dentes dos grupos controle e dentinogênese imperfeita (DGI). P-valor do teste t para amostras independentes em avaliação inter-grupo*.

Faces	Grupos	n	Média	Desvio Padrão	IC -95%	IC +95%	p
Vestibular	Controle	18	95,52 ^b	18,26	86,44	104,60	> 0,05
	DGI	13	69,63 ^a	12,98	61,78	77,47	
Distal	Controle	18	98,90 ^b	18,94	89,48	108,32	> 0,05
	DGI	13	63,07 ^a	11,57	56,08	70,06	
Palatina	Controle	18	93,13 ^b	13,73	86,31	99,96	> 0,05
	DGI	13	65,70 ^a	17,65	55,03	76,37	

* As comparações são realizadas inter-grupo, ou seja, entre os grupos em análise (Controle e DGI). Vestibular: $t=4,37$, p -valor=0,000; Distal: $t=5,39$, p -valor=0,000; Palatina: $t=4,99$, p -valor=0,000.

^a teste t; $p < 0,05$ = diferença entre as médias estatisticamente significativas com os dentes do Grupo Controle

^b teste t; $p < 0,05$ = diferença entre as médias estatisticamente significativas com os dentes do Grupo DGI

8.2.3 Resistência máxima à compressão

Em relação à RMC, foi possível verificar na avaliação intra-grupo que os dentes foram semelhantes entre si em cada um dos grupos analisados ($p > 0,05$). Sendo assim, é possível afirmar que os dentes apresentaram comportamentos semelhantes de acordo com o grupo ao qual fizeram parte (Tab. 14 e Fig. 26).

Na avaliação inter-grupo, verificou-se que os dentes do grupo controle apresentaram médias significativamente menores ($221,28 \pm 48,69$) do que as médias dos dentes com dentinogênese imperfeita ($254,01 \pm 48,50$) ($p < 0,05$) (Tab. 15 e Fig. 27).

Tabela 14 – Estatísticas descritivas (n, média e desvio padrão) e intervalos de confiança da RMC, em MPa, dos dentes dos grupos controle e dentinogênese imperfeita (DGI). P-valor do teste de Análise da Variância (ANOVA) em avaliação intra-grupo*.

Grupo	Dentes	N	Média	Desvio Padrão	IC -95%	IC +95%	p
Controle	D1	4	221,05	90,18	77,55	364,55	$p > 0,05$
	D2	4	227,00	31,69	176,57	277,43	
	D3	4	206,46	16,24	180,61	232,30	
	D4	3	194,51	71,48	16,95	372,07	
	D5	2	258,69	4,62	217,14	300,24	
	D6	3	235,53	3,77	226,17	244,88	
DGI	D1	3	242,63	76,77	51,92	433,34	$p > 0,05$
	D2	5	260,57	36,46	215,30	305,84	
	D3	4	291,52	63,58	190,35	392,70	
	D4	2	264,68	7,48	197,46	331,90	
	D5	4	224,01	34,50	169,11	278,90	
	D6	2	228,98	22,63	25,68	432,28	

* As comparações são realizadas intra-grupo, ou seja, apenas entre os dentes de cada uma dos grupos em análise (Controle e DGI).

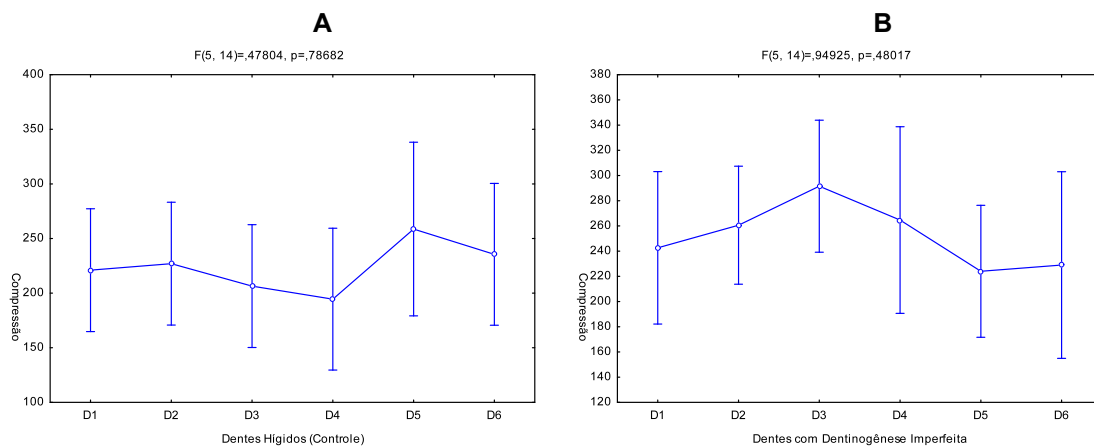


Figura 26 – Comparação intra-grupo das médias e intervalos de confiança da RMC, em MPa, dos espécimes dos dentes dos grupos A) controle e B) dentinogênese imperfeita (DGI).

Tabela 15 – Estatísticas descritivas (n, média e desvio padrão) e intervalos de confiança da RMC, em MPa, dos dentes dos grupos controle e dentinogênese imperfeita (DGI). P-valor do teste de t para amostras independentes em avaliação inter-grupo*.

Grupos	n	Média	Desvio Padrão	IC -95%	IC +95%	p
Controle	20	221,28 ^b	48,69	198,49	244,06	<0,05
DGI	20	254,01 ^a	48,50	231,31	276,71	

* As comparações são realizadas inter-grupo, ou seja, entre os grupos em análise (Controle e DGI). $t=2,13$, $p\text{-valor}=0,00853$.

^a teste t; $p<0,05$ = diferença entre as médias estatisticamente significativas com os dentes do Grupo Controle

^b teste t; $p<0,05$ = diferença entre as médias estatisticamente significativas com os dentes do Grupo DGI

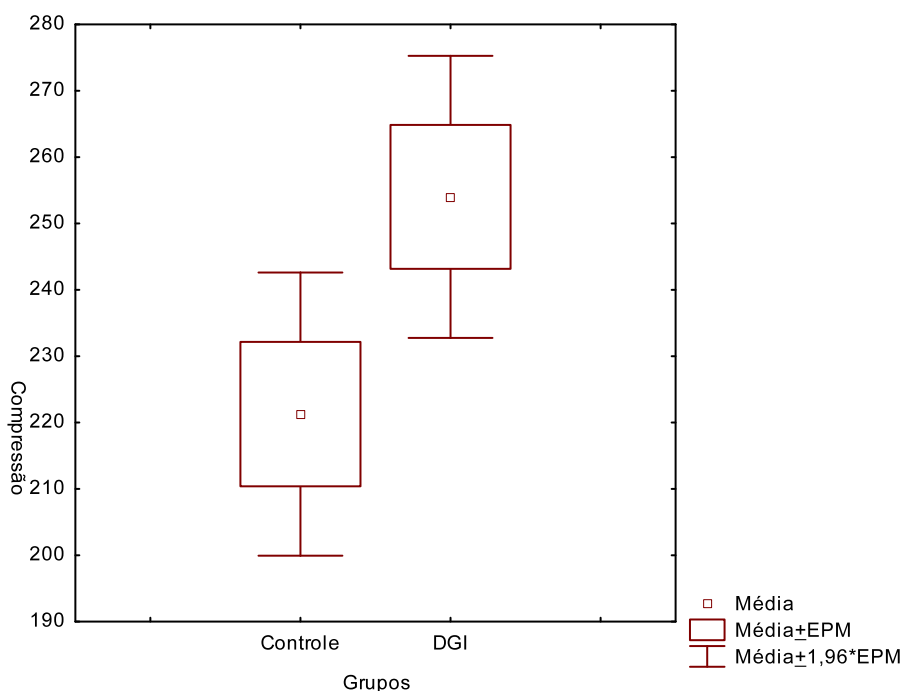


Figura 27 – Comparação inter-grupo das médias e intervalos de confiança da RMC Dos dentes dos grupos controle e dentinogênese imperfeita (DGI).

8.2.4 *Análise microestrutural*

O aspecto morfológico observado na dentina dos dentes do grupo DGI apresentou-se de duas maneiras diferentes. Em quatro espécimes, múltiplas áreas atubulares coexistiam com áreas morfológicamente semelhantes ao tecido dentinário normal. As áreas atubulares apresentaram-se como regiões extensas de dentina intertubular. As áreas tubulares presentes ainda mostraram concentração de túbulos dentinários com diâmetros diferentes. Outros dois espécimes do grupo DGI apresentaram uma desorganização na orientação tubular. Ademais, o diâmetro destes túbulos também era heterogêneo (Fig. 28).

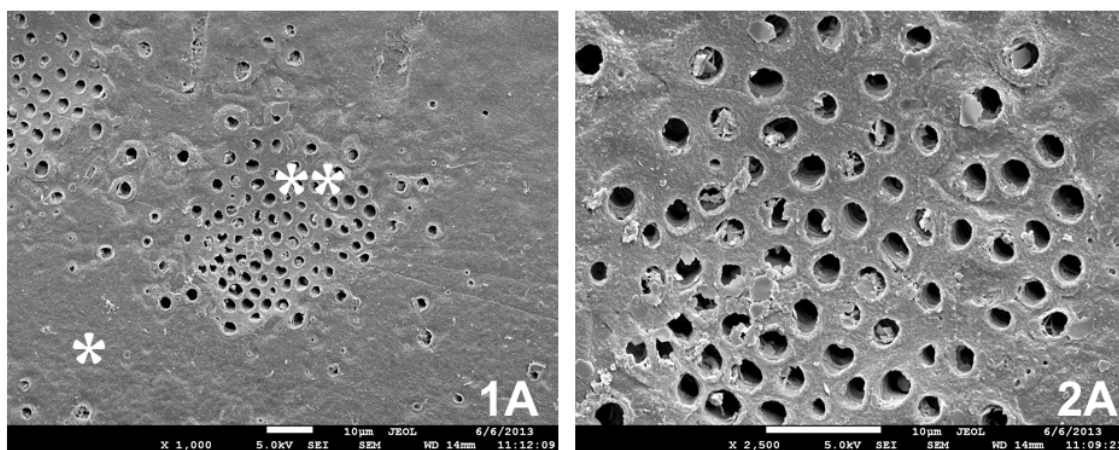


Figura 28 – 1A Dentina de dente afetado por DGI-II em aumento de 1.000x no qual verifica-se a presença de área atubular(*) e áreas com concentração de túbulos com diferentes diâmetros (**). 2A aumento de 2.500x da área (**).

8.3 *Padrão de curva obtido nos ensaios de resistência máxima à tração e resistência máxima à compressão*

Os ensaios de RMT foram realizados com um deslocamento prescrito até o limite estabelecido e as curvas carga-deslocamento geradas apresentaram, para todos os espécimes independentemente do grupo ao qual pertenciam, um padrão no qual inicialmente há uma relação linear entre estas duas grandezas, seguida de uma maior região de não-linearidade, até que a carga de ruptura fosse atingida. O gráfico ilustrativo do comportamento dos espécimes submetidos ao ensaio de RMT é representado pela Figura 29.

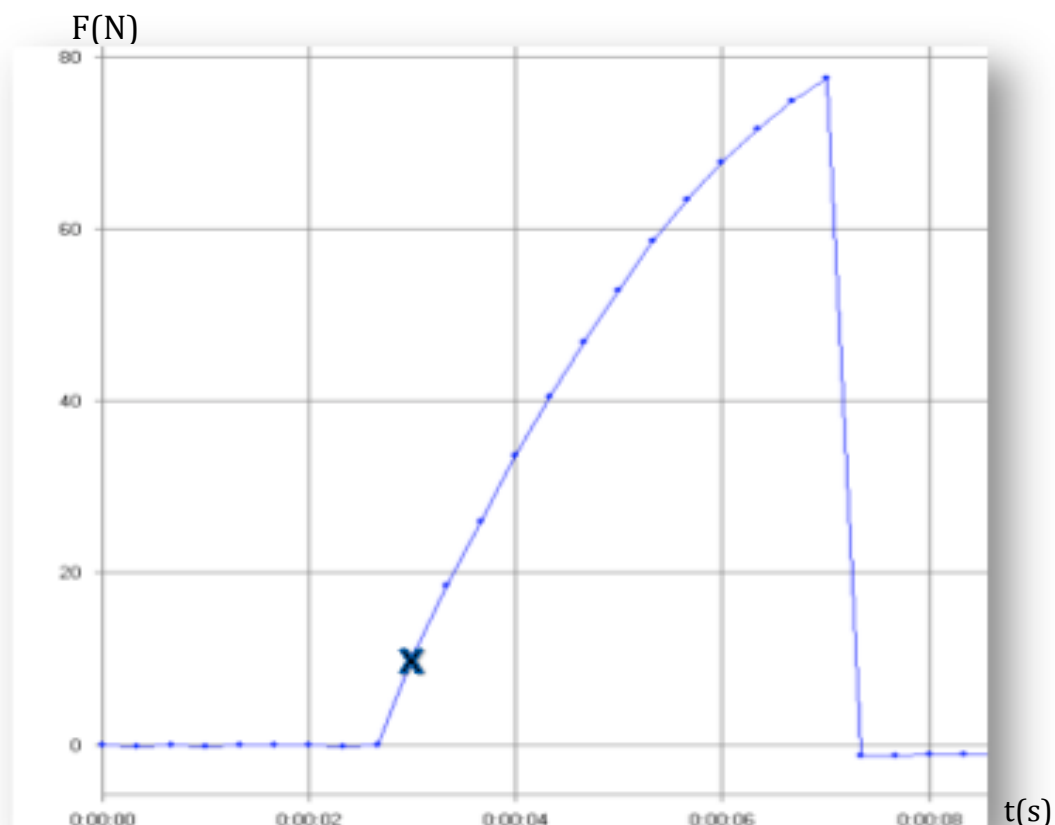


Figura 29 – Curva do comportamento dos espécimes de dentina no ensaio de RMT. O ponto “X” separa a região menor de linearidade entre carga e deslocamento da região maior de não-linearidade entre estas grandezas até o momento de ruptura do espécime.

Os ensaios de RMC também apresentaram um deslocamento prescrito e as curvas carga-deslocamento geradas apresentaram, também para todos os espécimes independentemente do grupo ao qual pertenciam, um padrão no qual inicialmente há uma relação linear entre as duas grandezas, seguida de uma pequena região de não-linearidade, até que a carga de ruptura fosse atingida. Após a ruptura, existe uma queda de carga recebida pelo espécime, fato relacionado à fratura do mesmo.

O gráfico ilustrativo do comportamento dos espécimes submetidos ao ensaio de RMC é representado pela Figura 30. Caso o ensaio não fosse interrompido, um acréscimo no deslocamento produzia uma recuperação dos valores de RMC do espécime, mas essa evidência estava relacionada ao

contato e esmagamento das partes fraturadas do espécime. Dessa forma, após a constatação da fratura do espécime, o ensaio era interrompido.

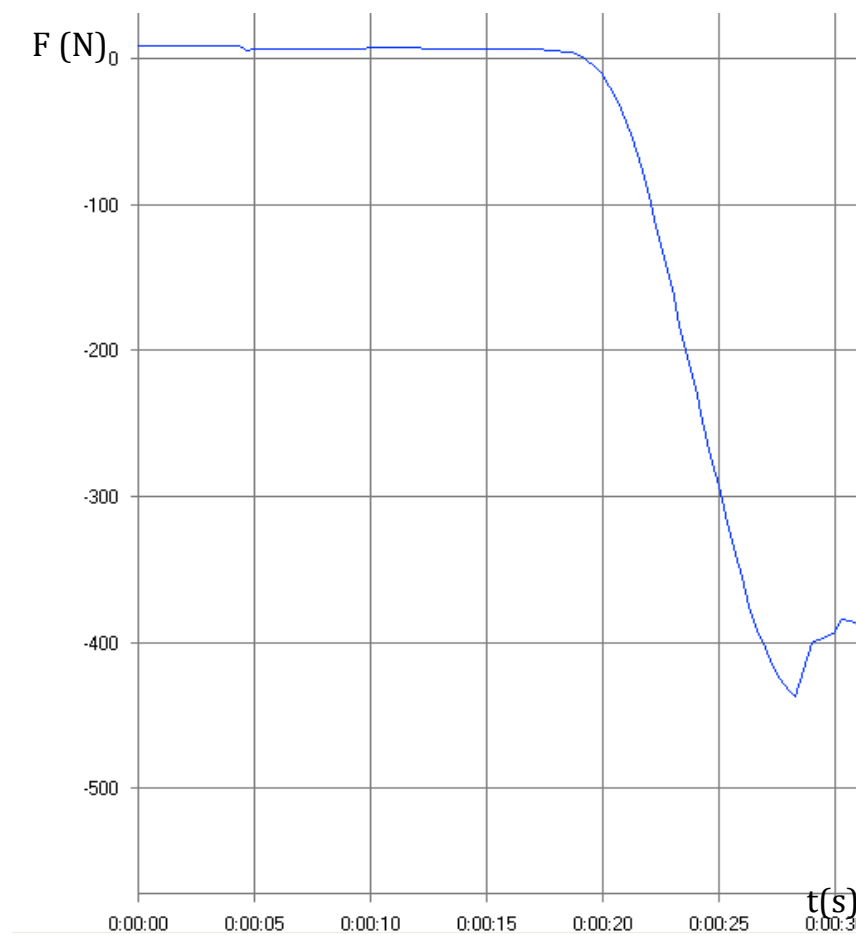


Figura 30 – Curva do comportamento dos espécimes de dentina no ensaio de RMC.

9. Discussão

9. Discussão

A análise comparativa dos dados obtidos neste estudo com os resultados de estudos executados com dentes não-afetados foi motivada pela ausência de informações acerca das propriedades mecânicas da dentina em dentes afetados pelas condições de AI e DGI-II.

9.1 Amelogênese imperfeita

Durante o exame clínico das pacientes do grupo AI, foram verificadas características fenotípicas semelhantes entre os dentes destas pacientes. O fato das pacientes serem irmãs poderia explicar esta constatação. A presença de uma lesão periapical em um dente molar inferior cariado e com cavitação de uma das pacientes, bem como as atrições no terço oclusal presentes em alguns dentes anteriores e posteriores das duas pacientes não estavam relacionadas a nenhum dos dentes doados e, dessa maneira, estes aspectos clínicos não interferiram negativamente em nenhum dos dados obtidos porque os critérios de inclusão, dentes hígidos, foram respeitados.

Os dentes terceiros molares utilizados no estudo apresentavam opacidades difusas e pequenas áreas hipoplásicas, mas não apresentavam nenhuma área com exposição dentinária, e nem foram, aparentemente, submetidos a nenhum fator agressor, fato que nos remete a supor que os dentes do grupo AI não possuíam dentina reacional que pudesse interferir nos valores de resistência à tração ou compressão, tendo em vista que a dentina terciária possui estrutura irregular e maior mineralização (66).

Com relação aos resultados dos ensaios mecânicos realizados, deve ser considerado o tamanho reduzido da amostra. Isso se deve ao fato da dificuldade de obtenção de dentes com esta suspeita diagnóstica e que apresentassem indicação de exodontia. Além disto, o fato de terem sido utilizados dentes provenientes de indivíduos de uma mesma família dificulta uma afirmação categórica relacionada aos resultados obtidos, mas deve ser

ênfatisado que o número de espécimes testados foi considerável tendo em vista a raridade da amostra. Ainda assim, em virtude da existência de diversos subtipos de AI, a hipótese diagnóstica relacionada à AI do tipo hipoplásico e hipomaturado deste estudo, remete a uma discussão relacionada somente a este tipo de hipótese diagnóstica.

Os valores de RMT da dentina no grupo AI foram inferiores àqueles do grupo controle. Apesar de ser uma condição hereditária que afeta o desenvolvimento do esmalte, foi verificada uma diferença estatisticamente significativa na RMT dentinária entre os grupos. A análise microestrutural não evidenciou quaisquer diferenças morfológicas entre a dentina dos espécimes avaliados dos grupos AI e controle. Dessa forma, a hipótese de que a estrutura morfológica da dentina de dentes do grupo AI não difere daquela dos dentes do grupo controle foi confirmada. Contudo, deve ser levado em consideração o fato de que a hipótese diagnóstica de AI do tipo hipoplásico e hipomaturado, caso dos dentes estudados, necessita de confirmação e que, uma vez confirmada tal hipótese, ainda temos outros subtipos de AI que carecem de análises dentinárias similares.

Ao ser considerada a similaridade microestrutural entre os grupos AI e controle, é provável que outros aspectos tenham impactado na diferença entre os valores de RMT apresentados. Pequenas discrepâncias entre as dimensões da área de seção transversal nas extremidades dos espécimes, trincas internas e alterações morfológicas geradas pelo aquecimento durante o preparo dos espécimes, além erros inerentes à aquisição de dados pela máquina de testes podem ser alguns dos fatores que contribuíram para estas constatações, mesmo sabendo que estas variáveis podem estar relacionadas a todos os espécimes dos grupos estudados. Ainda assim, apesar do protocolo de preparo dos espécimes, como nem todos foram preparados num mesmo dia, existe uma possibilidade da presença destas variáveis.

Uma outra suposição para tal constatação remete à composição mineral dos espécimes testados; entretanto, tal avaliação não foi objeto deste estudo. São poucos os estudos que avaliaram a composição mineral do esmalte afetado por hipomineralizações e hipocalcificações associadas à Amelogênese

Imperfeita (29,34). Avaliação da composição mineral da dentina de dentes afetados por AI é desconhecida. Talvez possa existir alguma diferença na composição mineral dentinária que ampare a diferença de RMT encontrada. A diferença inter-grupos constatada refuta a hipótese de que a RMT da dentina em dentes afetados pela condição de AI seja semelhante àquela dos dentes do grupo controle.

Os valores de RMT do grupo controle estão de acordo com os valores descritos na literatura. A velocidade de deslocamento da máquina de testes, 1mm/min, e o formato dos espécimes, palito, não foram semelhantes àqueles utilizados no estudo de resistência à microtração dentinária de Sano et al., 1994 (124). O formato de palito dos espécimes do presente estudo concentra menos tensões que espécimes em formato de ampulheta, como no estudo de Sano *et al.*, 1994, ou que apresentem algum tipo de preparo que concentre tensões na área de rompimento do espécime. Este fato poderia interferir negativamente nos resultados obtidos de ensaios mecânicos de RMT ou RMC da dentina. Ainda assim, os valores da média da RMT obtidos em dentes do grupo controle, 95MPa, foram similares aos da literatura.

A avaliação intra-grupo revelou que os dentes 1, 2 e 3 do grupo AI apresentaram valores de RMT inferiores aos valores dos dentes 4 e 5. Um fato relevante é que os dentes 1, 2 e 3 foram cedidos por uma paciente e os dentes 4 e 5 pela sua irmã, o que pode justificar a equivalência estatística dos valores entre os espécimes de uma mesma doadora. A menor idade da paciente doadora dos dentes 4 e 5 poderia justificar os valores mais elevados, em virtude de uma menor taxa de mineralização tecidual que indivíduos mais novos apresentam, em regra, frente à pacientes mais velhos, pela formação da dentina secundária (66). Ademais, indivíduos com ou sem consangüinidade podem apresentar diferenças na mineralização tecidual entre diferentes regiões dentárias e isto também poderia responder pela diferença observada no grupo AI (72). Contudo, os valores de RMT dos dentes do grupo controle, cujos doadores não apresentavam consangüinidade nem idade com a proximidade entre aquela das irmãs doadoras do grupo AI, foram equivalentes estatisticamente.

Os espécimes testados foram identificados quanto a região dentária da qual foram obtidos (vestibular, distal e lingual/palatina). Não foram verificadas diferenças intra-grupo entre nenhuma das regiões avaliadas durante o ensaio de RMT, tanto para o grupo AI quanto para o grupo controle.

Entretanto, na análise inter-grupo, ao serem comparados os resultados entre os espécimes originados da área vestibular entre o grupo AI e grupo controle, não foi observada diferença estatisticamente significativa. Somente os espécimes provindos das áreas palatina e distal apresentaram diferenças estatisticamente significantes entre os grupos. Como os espécimes submetidos à RMT são de áreas mais periféricas das coroas dentárias, espera-se que os túbulos dentinários dessas regiões estejam com orientação mais oblíqua à orientação do deslocamento aplicado, em virtude da distribuição radial dos túbulos dentinários no sentido polpa-JAD. Apesar de não terem sido testados espécimes com orientação tubular heterogênea neste estudo, deve ser levado em consideração o fato que, mesmo num único dente, a orientação dos túbulos dentinários pode ser levemente alterada em virtude da disposição sinuosa que os túbulos apresentam desde a região da polpa à junção amelodentinária. Diferenças, mesmo que sutis, na orientação tubular podem resultar em RMT diferentes que poderiam explicar as diferenças de média de RMT observadas intra-grupo e que poderiam resultar, na média, numa equivalência estatística entre regiões similares dos dois grupos.

Apesar das diferenças dos resultados obtidos nos ensaios de RMT, os espécimes dos grupos AI e controle não apresentaram diferenças dos resultados obtidos nos ensaios de RMC, fato que confirma a hipótese aventada de que os valores de RMC da dentina no grupo AI seriam semelhantes àqueles obtidos no grupo controle.

Segundo Rasmussen *et al.*, 1976 (128), 1984 (111), forças perpendiculares aos túbulos dentinários podem gerar uma fratura do espécime por ocasionar um rompimento entre as fibrilas de colágeno, enquanto forças paralelas aos túbulos apresentam uma maior dificuldade em romper tais fibrilas. A disposição da malha colagênica interfibrilar apresenta-se perpendicular à orientação dos túbulos dentinários. Os espécimes submetidos

aos ensaios de RMC são provenientes da região oclusal, onde os túbulos dentinários apresentam orientação paralela ao longo eixo dos dentes. Em virtude do formato retangular dos espécimes (com comprimento aproximadamente três vezes maior que a largura) e para que se evitasse o fenômeno da flambagem, os mesmos foram posicionados no dispositivo de tal forma que a carga fosse aplicada perpendicularmente ao seu comprimento e consequentemente também perpendicular à orientação tubular.

De acordo com o estudo de Watts, 1987 (126), o valor de média da resistência compressiva à temperatura de 23°C, foi de 270,9 MPa, mais alto que as médias obtidas para os grupos AI e controle, 210 e 221,3 MPa, respectivamente; entretanto, apesar da orientação tubular dos espécimes de ambos os estudos apresentar a mesma direção à aplicação da carga, o comprimento maior do espécime deste estudo ficou paralelo à superfície de apoio, fato que, como citado anteriormente, evita a ocorrência de esforços espúrios por flambagem, o que poderia justificar a diferença entre os resultados deste estudo e o estudo de Watts.

Os resultados obtidos nos ensaios de RMC, em dentes do grupo controle, estão próximos aos valores encontrados na literatura (125,126), fato que reforça a confiabilidade na utilização do dispositivo Flextest para este tipo de ensaio.

9.2 Dentinogênese imperfeita

As características fenotípicas dos dentes utilizados no grupo DGI-II eram semelhantes e os dentes afetados utilizados neste estudo também foram cedidos por pacientes que são irmãs. A coloração coronária acinzentada, o formato bulboso das coroas e a atresia dos condutos e câmaras pulpares presentes nos dentes destas pacientes, associado com o fato de existir um histórico familiar sem envolvimento de alterações em tecidos ósseos, definiram o diagnóstico da condição de dentinogênese imperfeita do tipo II. Apesar de apresentarem estas características clínicas, os dentes terceiros molares

doados ao estudo não apresentavam atrições ou exposições dentinárias ao meio bucal.

Os valores de RMT da dentina no grupo DGI-II foram inferiores àqueles do grupo controle. A condição hereditária de dentinogênese imperfeita remete a um desenvolvimento alterado do tecido dentinário. Dessa forma, a hipótese relacionada à menor RMT da dentina afetada pela condição de DGI-II foi confirmada.

A análise microestrutural evidenciou diferenças entre a dentina dos espécimes avaliados dos grupos DGI-II e controle. Os espécimes do grupo DGI-II apresentaram regiões atubulares em meio a áreas com túbulos adensados e com diâmetros diversificados, assim como descrito por outros estudos (144,145). Estas evidências sustentam a hipótese de que a estrutura da dentina de dentes afetados pela condição de DGI-II difere daquela dos dentes do grupo controle. Segundo Kinney *et al.*, 2003 (61), a presença de defeitos, imperfeições ou interferências estruturais na dentina faz com que os espécimes falhem com tensões de magnitude menor em comparação aos tecidos ou materiais com menor quantidade dessas variáveis. Estas alterações estruturais podem ser responsáveis pela menor RMT observada no grupo DGI-II.

Não foram verificadas diferenças intra-grupo entre os resultados de RMT dos espécimes provindos das áreas vestibular, distal ou palatina, tanto para o grupo DGI-II quanto para o grupo controle. Ao se considerar a análise inter-grupo, a diferença entre os valores da média da RMT, para qualquer uma das regiões de origem dos espécimes, foi constatada. Estes fatos podem estar relacionados a um suposto padrão microestrutural homogêneo entre os dentes afetados e entre os dentes do grupo controle. Ainda assim, reforça-se que tal constatação poderia estar relacionada à composição mineral dos espécimes avaliados, mas esta análise não foi objeto deste estudo. Outra justificativa plausível para tal constatação é o fato do parentesco entre as pacientes doadoras dos dentes utilizados na pesquisa.

O grupo DGI-II apresentou RMC maior que o grupo controle. Esta evidência contradiz a hipótese levantada de que a RMC da dentina em dentes

afetados pela condição de DGI-II seria inferior àquela dos dentes do grupo controle.

Segundo Kinney, 2003 (61,72), a dentina de dentes afetados por DGI-II apresenta uma falta de mineralização intrafibrilar e possui aproximadamente 67% do conteúdo mineral normal. Uma maior presença da porção orgânica colagênica em detrimento à porção inorgânica talvez esteja relacionada com essa capacidade em suportar maiores tensões compressivas em comparação ao grupo controle; entretanto, a avaliação do conteúdo mineral destes espécimes, como mencionado, não foi realizada no estudo.

Os resultados provenientes dos ensaios mecânicos realizados no grupo DGI-II também foram obtidos de uma amostra pequena. Essa condição hereditária é rara e existe uma dificuldade de obtenção de dentes afetados hígidos com indicação de exodontia. Ademais, pacientes portadores de DGI-II tendem a perder os dentes prematuramente em virtude da severidade de atrição dentária que normalmente possuem e planejamentos restauradores inadequados. Apesar deste fato, foi possível a confecção de um número razoável de espécimes para a realização dos ensaios mecânicos propostos. Ressalva deve ser feita com relação ao fato de existir um parentesco entre as pacientes doadoras dos dentes do grupo DGI-II. Estudos futuros com dentes afetados por DGI-II de outras famílias podem consubstanciar ou não os resultados aos ensaios de RMT e RMC obtidos neste estudo.

Adicionalmente à análise da composição inorgânica da dentina de dentes afetados por AI ou DGI-II e a influência deste aspecto nas propriedades analisadas, as resistências máximas à tração e à compressão exclusivamente do componente orgânico fibrilar poderão ser realizadas em estudos futuros. A desmineralização de espécimes similares aos obtidos no presente estudo seguida dos supracitados ensaios poderá também fornecer informações relevantes acerca do impacto que o componente orgânico da dentina de dentes afetados por AI ou DGI-II apresenta nas propriedades mecânicas destes dentes.

Inúmeros fatores interferem na avaliação das propriedades mecânicas dentinárias e muitos deles não podem ser controlados. Ainda assim, um melhor

entendimento das características teciduais normais e alteradas é fundamental para melhorar o prognóstico da integridade dos tecidos dentários afetados pelas condições de AI e DGI-II (29,146).

10. Conclusões

10. Conclusões

- 1- A resistência máxima à tração da dentina dos dentes com hipótese diagnóstica de Amelogênese Imperfeita do tipo hipomaturado e hipoplásico foi inferior à observada em dentes não afetados.
- 2- A resistência máxima à compressão da dentina dos dentes com hipótese diagnóstica de Amelogênese Imperfeita do tipo hipomaturado e hipoplásico foi semelhante à observada em dentes não afetados.
- 3- A resistência máxima à tração da dentina dos dentes com Dentinogênese Imperfeita foi inferior à observada em dentes não afetados.
- 4- A resistência máxima à compressão da dentina dos dentes com Dentinogênese Imperfeita foi superior à observada em dentes não afetados.
- 5- Não foram observadas alterações nas características ultraestruturais na dentina de dentes com hipótese diagnóstica de Amelogênese Imperfeita do tipo hipomaturado e hipoplásico.
- 6- Foram observadas alterações nas características ultraestruturais na dentina de dentes afetados por Dentinogênese Imperfeita tipo II.
- 7- Este é um estudo inédito acerca de algumas propriedades mecânicas da dentina de dentes afetados por AI e DGI-II. Mais estudos são necessários para o melhor entendimento das propriedades mecânicas de dentes afetados por estas condições.

11. Referências bibliográficas

11. Referências bibliográficas

1. Thesleff I, Vaahtokari A, Partanen AM. Regulation of organogenesis. Common molecular mechanisms regulating the development of teeth and other organs. *Int. J. Dev. Biol.*, 1995: 39; 35-50.
2. Thesleff I. Developmental biology and building a tooth. *Quintessence International*, 2003: 34(8); 613-20
3. Macdougall M, Dong J, Acevedo AC. Molecular basis of human dentin diseases. *American Journal of Medical Genetics*, 2006: 140A; 2536-46.
4. Ruch JV. Tooth crown morphogenesis and cytodifferentiations: candid questions and critical comments. *Connec. Tis. Res.*, 1995: 32 (1-4); 1-8.
5. Thesleff I, Vainio S, Jalkanen M. Cell-matrix interactions in tooth development. *Int. J. Dev. Biol.*, 1989: 33 (1); 91-97.
6. Hu JCC, Chun YHP, Hazzazzi TA, Simmer JP. Enamel formation and amelogenesis imperfecta. *Cells Tissues Organs*, 2007: 186; 78-85.
7. Thomas HF. Root formation. *Int. J. Dev. Biol.*, 1995: 39 (1); 231-37.
8. Smith CE, Nanci A. Overview of morphological changes in enamel organ cells associated with major events in amelogenesis. *Int. J. Dev. Biol.*, 1995: 39; 153-61.
9. Smith CE. Stereological analysis of organelle distribution within rat incisor enamel organ at successive stages of amelogenesis. In *Tooth Morphogenesis and Differentiation*. EDS. A. B. Belcourt and J-V. Ruch. INSERM 125, Paris, 1984; 273-82.
10. Nanci A, Smith CE. Development and calcification of enamel. In *Calcification In Biological systems*. Ed. E. Bonucci. CRC Press. Boca Raton, 1992; 313-43.
11. Simmer JP, Hu J. Dental enamel formation and its impact on clinical dentistry. *Journal of dental education*, 2001: 65(9); 896-905.
12. Nanci A, Warshawsky H. Characterization of putative secretory sites on ameloblasts of the rat incisor. *Am. J. Anat.*, 1984: 171(2); 163-89.

13. Zeichner-David M, Diekwisch T, Fincham A, Lau E, MacDougall M, Moradian-Oldak J, Simmer J, Snead M, Slavkin HC. Control of ameloblast differentiation. *Int J Dev Biol*, 1995; 39(1): 69-92.
14. Sasaki S, Shimokawa H. The amelogenin gene. *Int. J. Dev. Biol.*, 1995; 39(1); 127-33.
15. Robinson C, Kirkham J, Brookes SJ, Bonnas WA, Shore RC. The chemistry of enamel development. *Int. J. Dev. Biol.*, 1995; 39(1); 145-52.
16. Iwasaki K, Bajenova E, Somogyi-ganss E, Miller M, Nguyen V, Nourkeyhani H, Gao Y, Wendel M, Ganss B. Amelotin – a novel secreted, ameloblast-specific protein. *J. Dent. Res.*, 2005; 84(12); 1127-32.
17. Simmer JP, Fincham AG. Molecular mechanisms of dental enamel formation. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.*, 1995; 6 (2); 84-108.
18. Zeichner-David M. Is there more to enamel matrix proteins than biomineralization? *Matrix Biology*, 2001; 20; 307-16.
19. Veis, A. Amelogenin gene splice products: potential signaling molecules. *Cell Mol Life Sci*, 2003; 60(1): 38-55.
20. Robinson C, Brookes SJ, Shore RC, Kirkham J. The developing enamel matrix: nature and function. *Eur. J. Oral Sci.*, 1998; 106(1); 282-91.
21. Fincham AG, Moradian-oldak J, Simmer JP. The structural biology of the developing dental enamel matrix. *J. Struct. Biol.*, 1999; 126(3): 270-99
22. Nanci A. Ten Cate's Oral histology – Development, Structure and Function. Mosby. 6a edição, 2003.
23. Weber DF. Sheath configurations in human cuspal enamel. *J Morphol.*, 1973; 141(4): 479-489.
24. Park S, Wang DH, Zhang D, Romberg E, Arola D. Mechanical properties of human enamel as a function of age and location in the tooth. *J Mater Sci*, 2008; 19; 2317-24.
25. Suckling GW, Nelson DGA, Patel MJ. Macroscopic and scanning electron microscopic appearance and hardness values of developmental defects in human permanent tooth enamel. *Adv Dent Res*, 1989; 3(2); 219-33.

26. Witkop Jr CJ. Amelogenesis imperfecta, dentinogenesis imperfecta and dentin dysplasia revisited: problems in classification. *J Oral Pathol*, 1989; 17; 547-53.
27. Thesleff I. Genetic basis of tooth development and dental defects. *Acta Odontol Scand*, 2000;58; 191-94.
28. Wright JT. The molecular etiologies and associated phenotypes of amelogenesis imperfecta. *American Journal of medical genetics*, 2006: 140A; 2547-55.
29. Mahoney EK, Ismail FSM, Kilpatrick N, Swain M. Mechanical properties across hypomineralized/hypoplastic enamel of first permanent molar teeth. *Eur J Oral Sci*, 2004a: 112; 497-502.
30. Sholapurkar AA, Joseph RM, Varghese JM, Neelagiri K, Acharya SR, Hegde V, Pai KM, Bhat M. Clinical diagnosis and oral rehabilitation of a patient with amelogenesis imperfecta: a case report. *J Contemp Dent Pract*, 2008: 9(4): 92-98.
31. Aldred MJ, Savarirayan R, Crawford PJM. Amelogenesis imperfecta: a classification and catalogue for the 21ST century. *Oral diseases*, 2003;9, 19-23.
32. Crawford PJ, Aldred M, Bloch-Zupan A. Amelogenesis imperfecta. *Orphanet J Rare Dis*, 2007: 2: 17.
33. Backman B, Holm AK. Amelogenesis imperfecta: prevalence and incidence in a northern Swedish country. *Community Dent. Oral Epidemiol*, 1986: 14(1), 43-47.
34. Wright JT, Duggal MS, Robinson C, Kirkham J, Shore R. The mineral composition and enamel ultrastructure of hypocalcified amelogenesis imperfecta. *J Craniofac Genet Dev Biol*, 1993: 13; 117-26.
35. Backman B, Lundgren T, Engstrom EU, Falk LK, Chabala JM, Levi-setti R, Noren JG. The absence of correlations between a clinical classification and ultrastructural findings in amelogenesis imperfecta. *Acta Odontol. Scand.*, 1993: 51(2), 79-89.

36. Leppaniemi A, Lukinmaa PL, Alaluusua S. Nonfluoride hypomineralizations in the permanent first molars and their impact on the treatment need. *Caries Res.*, 2001; 35(1), 36-40.
37. Backman B, Anneroth G, Horstedt P. Amelogenesis imperfecta: a scanning electron microscopic and microradiographic study. *J Oral Pathol Med*, 1989; 18; 140-145.
38. Lagerstrom M, Dahl N, Nakahori Y, Nakagome Y, Backman B, Landegren U. A deletion in the amelogenin gene (AMG) causes X-linked amelogenesis imperfecta (AIH1). *Genomics*, 1991;10, 971-975.
39. Dong J, Gu TT, Simmons D, Macdougall M. Enamelin maps to human chromosome 4q21 within the autosomal dominant amelogenesis imperfecta locus. *Eur. J. Oral Sci*, 2000;108, 353-58.
40. Hart PS, Hart TC, Michalec MD, Ryu OH, Simmons D, Hong S. Mutation in kalikrein 4 causes autosomal recessive hypomaturational amelogenesis imperfecta. *J. Med. Genet.*,2004: 41, 545-59.
41. Kim JW, Simmer JP, Hart TC, Hart PS, Ramaswami MD, Bartlett JD. MMP-20 mutation in autosomal recessive pigmented hypomaturational amelogenesis imperfecta. *J. Med. Genet.*,2005a: 42, 271-75.
42. Dong J, Amor D, Aldred MJ, Gu TT, Escamilla M, Macdougall M. DLX3 mutation associated with autosomal dominant amelogenesis imperfecta with taurodontism. *Am. J. Med. Genet. A.*, 2005;133, 138-41.
43. El-Sayed W, Shore RC, Parry DA, Inglehearn CF, Mighell AJ. Hypomaturational amelogenesis imperfecta due to WDR72 mutations: a novel mutation and ultrastructural analyses of deciduous teeth. *Cell Tissue Res* 2011;194(1): 60-6.
44. Parry DA, et al. Mutations in C4orf26, encoding a peptide with in vitro hydroxyapatite crystal nucleation and growth activity, cause amelogenesis imperfecta. *Am J Hum Genet* 2012;91(3):565-71.
45. Wang SK, et al. FAM20A mutations can cause enamel-renal syndrome (ERS). *PLoS Genet* 2013;9(2):e1003302.
46. Poulter JA, El-Sayed W, Shore RC, Kirkham J, Inglehearn CF, Mighell AL. Whole-exome sequencing, without prior linkage, identifies a mutation

- in LAMB3 as a cause of dominant hypoplastic amelogenesis imperfecta. *Eur J Hum Genet* 2013; 22, 132–135.
47. Kerebel B, Daculsi G. Ultrastructural study of amelogenesis imperfecta. *Calcif Tiss Res* 1977;24(2):191-7.
48. Uzamis M, Celik H, Erkmen N, Batirbaygil Y. Scanning electron microscopic study of hypoplastic type amelogenesis imperfecta in primary teeth. *J Clin Ped Dent* 1997;21(3):265-8.
49. Seymen F, Kiziltan B. Amelogenesis imperfecta: a scanning electron microscopic and histopathologic study. *J Clin Ped Dent* 2002;26(4):327-35.
50. Escobar VH, Goldblatt LI, Bixler D. A clinical, genetic, and ultrastructural study of snow-capped teeth: amelogenesis imperfecta, hypomaturation type. *Oral Surg Med Pathol* 1981;52(6):607-14.
51. Wright JT, Lord V, Robinson C, Shore R. Enamel ultrastructure in pigmented hypomaturational amelogenesis imperfecta. *J Oral Pathol Med* 1991;21(9):390-4.
52. Wright JT, Duggal MS, Robinson C, Kirkham J, Shore R. The mineral composition and enamel ultrastructure of hypocalcified amelogenesis imperfecta. *J Craniofac Genet Develop Biol* 1993;13(2):117-26.
53. Mahoney EK, Rohanizadeh R, Ismail FS, Kilpatrick NM, Swain MV. Mechanical properties and microstructure of hypomineralised enamel of permanent teeth. *Biomaterials* 2004b;25(20):5091-100.
54. Sanchez-quevedo MC, Ceballos G, Garcia JM, Luna JD, Rodriguez IA, Campos A. Dentine structure and mineralization in hypocalcified amelogenesis imperfecta: a quantitative X-ray histochemical study. *Oral Disease*, 2004;10(2), 94-8.
55. Linde A, Goldberg M. Dentinogenesis. *Critical reviews in oral biology and medicine*, 1993; 4(5); 679-728.
56. Arana-Chavez VE, Massa L. Odontoblasts: the cell forming and maintaining dentine. *The international journal of biochemistry and cell biology*, 2004; 36; 1367-1373.

57. Bonucci E. Matrix vesicles: their role in classification. *Dentin and Dentinogenesis*. CRC Press 1984;1:135-54.
58. Anderson HC. Molecular biology of matrix vesicles. *Clin Orthop Relat Res* 1995; 314:266-80.
59. Bonucci E. Crystal ghosts and biological mineralization: fancy spectres in an old castle, or neglected structures worthy of belief? *J Bone Miner Metab* 2002;20(5):249-65.
60. Hart PS, Hart TC. Disorders of human dentin. *Cell Tiss Org* 2007;186(1):70-7.
61. Kinney JH, Habelitz S, Marshall SJ, Marshall GW. The importance of intrafibrillar mineralization of collagen on the mechanical properties of dentin. *J Dent Res*, 2003a: 82(12); 957-61.
62. Garberoglio R, Brannstrom M. Scanning electron microscopic investigation of human dentinal tubules. *Arch. Oral Biol.*, 1976: 21(6), 355-62.
63. Pashley DH, Nelson R, Kepler EE. The effects of plasma and salivary constituents on dentin permeability. *J. Dent. Res.*, 1982: 61(8), 978-981.
64. Dai XF, Tencate AR, Limeback H. The extent and distribution of intratubular collagen fibrils in human dentine. *Arch. Oral Biol.*, 1991: 36(10), 775- 78.
65. Marshall Jr GW. Dentin: microstructure and characterization. *Quintessence International*, 1993: 24(9); 606-17.
66. Katchburian E, Arana V. *Histologia e Embriologia oral*. Segunda edição. Editorial Médica Panamericana, 2004.
67. Mjor IA, Fejerskov O. *Histology of the human tooth*, 2nd edn. Munksgaard, Copenhagen, 1979.
68. Driessens FCM, Verbeeck RMH *Biominerals*. CRC Press, Boca Raton, 1990; 163-78.
69. Van der Graaf E, Ten Bosch J. The uptake of water by freeze-dried human dentine sections. *Arch Oral Biol*, 1990:35;731-39.
70. Toto PD, Kastelic EF, Duyvejonck KJ, Rapp GW. Effect of age on water content in human teeth. *J. Dent. Res.*, 1971:50,1284-85.

71. Boskley AL. Biomineralization: an overview. *Connect. Tissue Res.*, 2003; 44(1); 5-9.
72. Kinney JH, Marshall SJ, Marshall GW. The mechanical properties of human dentin: a critical review and re-evaluation of the dental literature. *Crit Rev Oral Biol Med*, 2003b; 14(13); 13-29.
73. Butler WT. Dentin matrix proteins and dentinogenesis. *Connect. Tissue Res.*, 1985; 33(1-3); 59-65.
74. Kiefer MC, Bauer DM, Barr PJ. The cDNA and derived amino acid sequence for human osteopontin. *Nucleic Acids Res.*, 1989; 17(8).
75. Hirst KL, Simmons D, Feng J, Aplin H, Dixon MJ, Macdougall M. Elucidation of the sequence and the genomic organization of the human dentin matrix acidic phosphoprotein 1 (DMP 1) gene: exclusion of the locus from a causative role in the pathogenesis of dentinogenesis imperfecta type II. *Genomics*, 1997; 42(1); 38-45.
76. Gu K, Smoke RH, Rutherford RB. Expression of genes for bone morphogenetic proteins and receptors in human dental pulp. *Arch. Oral Biol.*, 1996; 41(10); 919-23.
77. Rowe PS, Zoysa PA, Dong R, Wang HR, White KE, Econs MJ, Oudet CL. MEPE, a new gene expressed in bone marrow and tumors causing osteomalacia. *Genomics*, 2000; 67(1); 54-68.
78. Butler WT, Brunn JC, Qin C. Dentin extracellular matrix (ECM) proteins: comparison to bone ECM and contribution to dynamics of dentinogenesis. *Connect. Tissue Res.*, 2003; 44(1); 171-78.
79. Macdougall M, Simmons D, Luan X, Nydegger J, Feng J, Gu TT. Dentin phosphoprotein and dentin sialoprotein are cleavage products expressed from a single transcript coded by a gene on human chromosome 4. Dentin phosphoprotein DNA sequence determination. *J. Biol. Chem.*, 1997; 272(2); 835-42.
80. Feng JQ, Luan X, Wallace J, Jung D, Ohshima T, Kulkarni AB, D'souza RN, Kozak CA, Macdougall M. Genomic organization, chromosomal mapping, and promoter analysis of the mouse dentin sialophosphoprotein (DSPP) gene, which codes for both dentin

- sialoprotein and dentin phosphoprotein. *J. Biol. Chem.*,1998: 273(16); 9457-464.
81. Malmgren B, Lindskog S, Elgadi A, Norgren S. Clinical, histopathologic, and genetic investigation in two large families with dentinogenesis imperfecta type II. *Hum Genet*, 2004: 114; 491-98.
 82. MacDougall M, Dong J, Acevedo AC. Molecular basis of human dentin diseases. *Am J Med Genet. Part A* 2006;140(23):2536-46.
 83. Shields D, Bixler D, El-kafrawy AM. A proposed classification for heritable human dentine defects with a description of a new entity. *Arch. Oral Biol.*, 1973: 18(4); 543-53.
 84. Kim JW, Hu JCC, Lee JI, Moon SK, Kim YJ, Jang KT, Lee SH, Kim CC, Haln SH, Simmer JP. Mutational hot spot in the DSPP gene causing dentinogenesis imperfecta type II. *Hum Genet*, 2005: 116; 186-91.
 85. Kim JW, Simmer JP. Hereditary dentin defects. *J Dent Res*, 2007: 86(5), 392-99
 86. Rios D, Tenuta LMA, Machado MAAM. Osteogenesis imperfecta and dentinogenesis imperfecta: associated disorders. *Quintessence International*, 2005: 36(9); 695-701.
 87. Paterson CR, Mcallion S, Miller R. Osteogenesis imperfecta with dominant inheritance and normal sclerae. *The Journal of bone and joint surgery*,1983: 65-B(1); 35-9.
 88. Huber MA. Osteogenesis imperfecta. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral radiol. And Endod.*,2007: 103(3); 314-20.
 89. Witkop CJ. Hereditary defects in enamel and dentin. *Acta Genet. Stat. Med.*, 1957:7(1); 236-39.
 90. Macdougall M. Refined mapping of the human dentin sialophosphoprotein (DSPP) gene within the critical dentinogenesis imperfecta type II and dentin dysplasia type II loci. *Eur. J. Oral Sci.*, 1998: 106(1); 227-33.
 91. Malmgren B, Lindskog S. Assessment of dysplastic dentin in osteogenesis imperfecta and dentinogenesis imperfecta. *Acta Odontol Scand.*,2003: 61(2); 72-80.

92. Acevedo AC, Santos LJS, Paula LM, Dong J, Macdougall M. Phenotype characterization and DSPP mutational analysis of three Brazilian dentinogenesis imperfecta type II families. *Cells Tissues Organs*, 2008; 189(1-4); 230-236
93. Witkop Jr. CJ, Maclean CJ, Schmidt PJ, Henry JL. Medical and dental findings in the Brandwyne isolate. *Ala J. Med. Sci.*, 1966;3(4); 382-403.
94. Hodge H, Finn S, Robinson HBG, Manly RS, Lefevre MM, van Huysen G, Bale WF. Hereditary opalescent dentin. Histological, chemical and physical studies. *J. Dent. Res.*, 1940;19; 521-36.
95. Kerebel B, Daculsi G, Menanteau J, Kerebel LM. The inorganic phase in dentinogenesis imperfecta. *J Dent Res* 1981;60(9):1655-60.
96. Xu HHK, Smith DT, Jahanmir S, Romberg E, Kelly JR, Thompson VP, Rekow ED. Indentation damage and mechanical properties of human enamel and dentin. *J Dent Res*, 1998; 77(3); 472-80.
97. Khan AS, Huang S. *Continuum Theory of Plasticity*. John Wiley & Sons, Inc. 1999.
98. Gere JM. *Mecânica dos materiais*. Editora Thomson, 2003.
99. Shono Y, Terashita M, Pashley EL, Brewer PD, Pashley DH. Effects of cross-sectional area on resin-enamel tensile bond strength. *Dent. Mater.*, 1997; 13; 290-96.
100. Shono Y, Terashita M, Shimada J, Kozono Y, Carvalho RM, Russell CM, Pashley DH. Durability of resin-dentin bonds. *The Journal of Adhesive Dentistry*, 1999; 1(3); 211-17
101. Zheng L, Pereira PNR, Nakajima M, Sano H, Tagami J. Relationship between adhesive thickness and microtensile bond strength. *Operative Dentistry*, 2001; 26;97-104.
102. Reis A, Carrilho MRO, Schroeder M, Tancredo LLF, Loguercio AD. The influence of storage time and cutting speed on microtensile bond strength. *J Adhes Dent*. 2004; 6: 7-11.
103. Ozer F, Sengun A, Ozturk B, Say EC, Tagami J. Effect of tooth age on microtensile bond strength of two fluoride-releasing bonding agents. *The Journal of Adhesive Dentistry*, 2005;7(4);289-95.

104. Carvalho RM, Sano H, Ciucchi B, Yoshiama M, Pashley DH. Determinação da resistência adesiva a dentina através de um dispositivo de microtração. *Revista da FOB*, 1994;2(3); 77-82.
105. Ibarra G, Vargas MA, Armstrong SR, Cobb DS. Microtensile bond strenght of self-etching adhesives to ground and unground enamel. *Journal of Adhesive Dentistry*, 2002;4; 115-24.
106. Garcia FCP, D`alpino PHP, Terada RSS, Carvalho RM. Testes mecânicos para a avaliação laboratorial da união resina/dentina. *Rev Fac Odontol Bauru*, 2002: 10(3); 118-27.
107. Botta AC, Salvia ACRD, Júnior LN, Pavanelli CA, Pagani C. Influence of different devices on microtensile strength. *Braz Dent Sci*. 2009; 12: 34-9.
108. Garcia A, Spim JA, Dos santos CA. *Ensaio dos materiais*. Editora LTC: 7-45, 2000.
109. Anusavice KJ. *Phillips Materiais Dentários*. 11a edição, Editora Elsevier, 2005.
110. Tesch W, Eidelman N, Roschger P, Goldenberg F, Klaushofer K, Fratzl P. Graded microstructure and mechanical properties of human crown dentin. *Calcif Tissue Int*, 2001: 69; 147-57.
111. Rasmussen ST, Patchin RE. Fracture properties of human enamel and dentin in an aqueous environment. *J Dent Res*, 1984: 63; 1362-68.
112. Waters NE. Some mechanical and physical properties of teeth. *Symp. Soc. Exp. Biol.*, 1980;34;99-135.
113. Habelitz S, Balooch M, Marshall SJ, Balooch G, Marshall Jr GW. In situ atomic force microscopy of partially demineralized human dentin collagen fibrils. *Journal of structural biology*, 2002: 138; 227-236.
114. Trengrove HG, Carter GM, Hood JAA. Stress relaxation properties of human dentin. *Dent Mater*, 1995: 11; 305-10.
115. Mahoney EK, Holt A, Swain M, Kilpatrick N. The hardness and modulus of elasticity of primary molar teeth: an ultra-micro-indentation study. *Journal of Dentistry*, 2000: 28; 589-94.

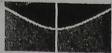
116. Pashley DH, Okabe A, Parham P. The relationship between dentin microhardness and tubule density. *Endod. Dent. Traumatol.*, 1985: 1(5);176-79.
117. Kinney JH, Balooch M, Marshall SJ, Marshall Jr GW, Weihs TP. Atomic force microscope measurements of the hardness and elasticity of peritubular and intertubular human dentin. *Journal of Biomechanical Engineering*, 1996a: 118; 133-35.
118. Kinney JH, Balooch M, Marshall SJ, Marshall Jr GW, Weihs TP. Hardness and young's modulus of human peritubular and intertubular dentine. *Archs oral Biol*, 1996b: 41(1); 9-13.
119. Pashley DH. Dentin permeability. *Experimental endodontics*. CRS Press, Boca raton, FL, 19-49, 1995.
120. Kinney JH, Balooch M, Marshall GW, Marshall SJ. A micromechanics model of the elastic properties of human dentine. *Archives of oral biology*, 1999: 44; 813-22.
121. Nalla RK, Imbeni V, Kinney JH, Staninec M, Marshall SJ, Ritchie RO. On the in vitro fatigue behavior of human dentin with implications for life prediction. *J. Biomed. Mater. Res*, 2002.
122. Bowen RL, Rodriguez MS. Tensile strength and modulus of elasticity of tooth structure and several restorative materials. *J. Am. Dent. Assoc.*, 1962: 64; 378-87.
123. Lehman ML. Tensile strength of human dentin. *J Dent Res*, 1967: 46(1); 197-201.
124. Sano H, Ciucchi B, Matthews WG, Pashley DH. Tensile properties of mineralized human and bovine dentin. *J Dent Res*, 1994: 73(6); 1205-11.
125. Craig RG, Peyton FA. Elastic and mechanical properties of human dentin. *J Dent Res*, 1958: 37(4); 710-18.
126. Watts DC, El Mowafy OM, Grant AA. Temperature-dependence of compressive properties of human dentin. *J Dent Res*, 1987: 66(1); 29-32.
127. Zaytsev D, Grigoriev S, Panfilov P. Deformation behavior of human dentin under uniaxial compression. *International Journal of Biomaterials*, 2012;1-8.

128. Rasmussen ST, Patchin RE, Scott DV, Heuer AH. Fracture properties of human enamel and dentin. *J Dent Res*, 1976: 55; 154-64.
129. Liu J, Hattori M, Hasegawa K, Yoshinari M, Kawada E, Oda Y. Effect of tubule orientation and dentin location on the microtensile strength of bovine root dentin. *Dental Materials Journal*, 2002: 21(2);73-82.
130. Arola DD, Reprogel RK. Tubule orientation and the fatigue strength of human dentin. *Biomaterials*, 2006: 27(9); 2131-40.
131. Bedran-de-Castro AK, Pereira PN, Thompson JY. Influence of load cycling and tubule orientation on ultimate tensile strength of dentin. *J Adhes Dent*, 2004: 6(3); 191-4.
132. Carvalho RM, Fernandes CA, Villanueva r, Wang L, Pashley DH. Tensile strength of human dentin as a function of tubule orientation and density. *J Adhes Dent*, 2001: 3(4); 309-14.
133. Kinney JH, Pople JA, Driessen GH, Breunig TM, Marshall GM, Marshall SJ. Intrafibrillar mineral may be absent in dentinogenesis imperfecta type II (DI-II). *Journal of Dental Research*, 2001: 80; 1555-9.
134. Balooch M, Habelitz S, Kinney JH, Marshall SJ, Marshall GW. Mechanical properties of mineralized collagen fibrils as influenced by demineralization. *Journal of structural biology*, 2008: 162; 404-410.
135. Reis AF, Oliveira MT, Giannini M, De goes MF, Rueggerberg FA. The effect of organic solvents on one-bottle adhesives bond strength to enamel and dentin. *Operative Dentistry*, 2003: 28(6); 700-06.
136. Silva ALF, Lima DANL, Souza GMD, Santos CTD, Paulillo LAMS. Influence of additional adhesive application on the microtensile bond strength of adhesive systems. *Oper Dent*, 2006; 31: 562-68.
137. Yoshikawa T, Sano H, Burrow MF, Tagami J, Pashley DH. Effects of dentin depth and cavity configuration on bond strength. *J Dent Res*. 1999; 78: 898-905.
138. Soares CJ, Soares PV, Santos-Filho PCF, Armstrong SR. Microtensile specimen attachment and shape - finite element analysis. 2008; 87: 89-93.

139. Perdigão J, Geraldeli S, Carmo AR, Dutra HR. In vivo Influence of Residual Moisture on Microtensile Bond Strengths of One-Bottle Adhesives. *J Esthet Restor Dent*. 2002; 14: 31–8.
140. Toledano M, Osorio R, Albaladejo A, Aguilera FS, Tay FR, Ferrari M. Effect of cycling loading on the microtensile bond strengths of total-etch and self-etch adhesives. *Oper Dent*, 2006; 31: 25-32.
141. Toledano M, Osorio R, Ceballos L, Fuentes MV, Fernandes CAO, Tay FR, Carvalho RM. Microtensile bond strength of several adhesive systems to different dentin depths. *Am J Dent*. 2003; 16: 292-8.
142. Garcia FCP, Almeida JCF, Osorio R, Carvalho RM, Toledano M. Influence of drying time and temperature on bond strength of contemporary adhesives to dentine. *J Dent*. 2009; 37:315-20.
143. Raposo LH, Armstrong SR, Maia RR, Qian F, Geraldeli S, Soares CJ. Effect of specimen gripping device, geometry and fixation method on microtensile bond strength, failure mode and stress distribution: laboratory and finite element analyses. *Dent Mater*. 2012 May;28: e50-62.
144. Kerebel B. Dentinogenesis imperfecta: a structural and ultrastructural study. *Suiss Odontol Stomat* 1975;85(12):1264-81.
145. Waltimo J, Ranta H, Lukinmaa PL. Ultrastructure of dentin matrix in heritable dentin defects. *Scannig Microsc* 1995;9(1):185-97.
146. Kishen A, Ramamurty U, Asundi A. Experimental studies on the nature of property gradients in the human dentine. *J Biomed Mater Res*, 2000: 51; 650-659.

ANEXOS

Anexo 1. Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa


Universidade de Brasília
Faculdade de Ciências da Saúde
Comitê de Ética em Pesquisa – CEP/FS

PROCESSO DE ANÁLISE DE PROJETO DE PESQUISA

Registro do Projeto no CEP: **078/09**

Título do Projeto: Avaliação das propriedades mecânicas de tecidos entários mineralizados em dentes afetados por amelogênese imperfeita e dentinogênese imperfeita.

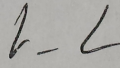
Pesquisadora Responsável: Gustavo Adolfo Gonçalves Rivera M. Santos

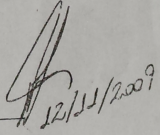
Data de Entrada: 13/08/2009

Com base na Resolução 196/96, do CNS/MS, que regulamenta a ética em pesquisa com seres humanos, o Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília, após análise dos aspectos éticos e do contexto técnico-científico, resolveu **APROVAR** o projeto **078/09** com o título: “Avaliação das propriedades mecânicas de tecidos dentários mineralizados em dentes afetados por amelogênese imperfeita e dentinogênese imperfeita”, analisado na 9ª Reunião Ordinária, realizada no dia 13 de outubro de 2009.

A pesquisadora responsável fica, desde já, notificada da obrigatoriedade da apresentação de um relatório semestral e relatório final sucinto e objetivo sobre o desenvolvimento do Projeto, no prazo de 1 (um) ano a contar da presente data (item VII.13 da Resolução 196/96).

Brasília, 13 de outubro de 2009.


Prof. Volnei Garrafa
Coordenador do CEP-FS/UnB



Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos - Faculdade de Ciências da Saúde
Universidade de Brasília - Campus Universitário Darcy Ribeiro - CEP: 70.910-900
Telefone: (61)-33073799 Email: cepts@unb.br

Anexo 2. Artigo**A comparative study of a new microtensile testing device**

Gustavo RIVERA¹, Lilian Marly DE PAULA², Tien Li AN³, Fernanda Cristina Pimentel GARCIA⁴, Paulo Márcio YAMAGUTI⁵, Andréia de Aquino MARSIGLIO¹, Raquel Lana PASSOS⁶, Ana Carolina ACEVEDO⁷, José Alexander ARAÚJO⁸

- 1- DDS, MSc, Professor, Department of Operative Dentistry, School of Dentistry, Catholic University of Brasília, Brasília, DF, Brazil.
- 2- DDS, MSc, PhD, Associate Professor, Department of Operative Dentistry, School of Dentistry, University of Brasília, Brasília, DF, Brazil.
- 3- DDS, MSc, PhD, Associate Professor, Department of Orthodontics, School of Dentistry, University of Brasília, Brasília, DF, Brazil.
- 4- DDS, MSc, PhD, Associate Professor, Department of Operative Dentistry and Dental Materials, School of Dentistry, University of Brasília, Brasília, DF, Brazil.
- 5- DDS, MSc, PhD, Private Practice, University of Brasília, Brasília, DF, Brazil.
- 6- Professor, Department of Operative Dentistry, School of Dentistry, Catholic University of Brasília, Brasília, DF, Brazil.
- 7- DDS, MSc, PhD, Professor, Department of Dentistry, School of Dentistry, University of Brasília, Brasília, DF, Brazil.
- 8- DDS, MSc, PhD, Professor, Department of Mechanical Engineering, School of Technology, University of Brasília, Brasília, DF, Brazil.

Corresponding address: Gustavo Rivera – Universidade Católica de Brasília – Curso de Odontologia - SQN 402 - Bloco S – Apt. 102 CEP 70834-19 Asa Norte, Brasília - DF, Brasil. Fone: 55 61 3107-1945 – 55 61 81770548 - Fax: 55 61 3107-1943 – e-mail: rivera.gustavo@gmail.com

Abstract

This study aimed to compare the performances of a new microtensile bond strength (μ TBS) testing device. Fifteen human third molars were submitted to dentin surfaces exposure, polishing, bonding treatment, composite blocks built-up, and sectioning, in order to obtain composite/dentin stick-shaped specimens with cross-sectional area of approximately 0.9mm^2 . A hundred composite/dentin specimens were assigned randomly to Bencor Multi-T group ($n=50$) and Flextest group ($n=50$), which were subdivided, respectively, into 8 and 7 subgroups. Tensile bond testing was done by using an universal testing machine (MTS, Eden prairie, Minnesota, USA) at a cross-head speed of 1.0mm/min . The intra-group and intergroup μ TBS comparisons, as well as the ratios of the types of failure in each group were analyzed by factorial ANOVA, Fisher`s tests and *Chi* square test, at 5% of significance. Both devices showed significant intra-group differences. However, the differences were not significant when the devices were compared. The new device showed similar performance in comparison to Bencor Multi-t device.

Key words: microtensile test, microtensile test device, dentin bond strength.

1. Introduction

Microtensile bond strength (μ TBS) test was first introduced by Sano *et al.*¹ to evaluate the ultimate tensile strength and modulus of elasticity of mineralized and demineralized dentin. Currently, μ TBS test is a common approach to evaluate the bond strength of adhesive materials to teeth. In comparison to the conventional method, μ TBS test is able to load multiple test specimens from each tooth so that the means and variances can be calculated for a single tooth. Additionally, adhesive failures are more frequent than cohesive failures during μ TBS test, so that measurement of higher values of interfacial bond strengths and testing of irregular surfaces and of relatively small areas are allowed. The drawback of μ TBS test involves more laborious techniques.

Although papers have been published, no broad agreement can be evidenced within the scientific community as to the standard protocol, which is the most appropriate testing device, application and interpretation of these methods. During the test, some factors, such as adhesive materials, adhesive application methods, the geometry and dimensions of the specimens, load application as well as factors inherent to the testing device may influence on the microtensile bond strength test results.²⁻⁴ Specifically, the testing device performances may interfere in the cohesive microtensile values and in the tensile force distribution pattern through the specimen.⁵

The ideal microtensile testing devices should be able to provide moment-free axial force application and should also render accurate specimen fixation.

In targeting these goals, some testing devices have been developed, namely, Geraldeli, Andreato Filho, Borges, MT-jig and Bencor Multi-T device.⁵⁻⁶ Botta *et al.*⁵ compared the performance of three different testing devices with the customized gauge for microtensile test and found that the devices significantly differed in performance and, consequently, resulted in discrepant microtensile bond strength values. Bencor Multi-T device has been used broadly in an amount of studies; however, little information is available with regard to its accuracy in comparison to other devices. Furthermore, new testing devices can be evolved with improvements in the structural design, in the mechanical features as well as in its functionalities.

With this concern, a project for a new microtensile/compressive device, named Flextest device, has been designed by mechanical engineers from the University of Brasilia (Brasília, DF, Brazil) and Mitay Industrial Precision Mechanics Company (Cotia, SP, Brazil). The Flextest device has been developed in order to assure the correct positioning and fixation of the specimen and a better distribution of tensile forces to all surfaces of the specimen. Moreover, the device was designed to perform compression tests. The aims of the present study are two folds: firstly, to evaluate the viability of Flextest device for microtensile tests and, secondly, to compare its performance with Bencor Multi-T device quantitatively and qualitatively.

Materials and Methods

The Ethics Committee of the School of Health Sciences at the University of Brasilia approved the present study. All patients that agreed to participate in this study signed an informed consent statement.

For sample selection, fifteen functionless partially or totally erupted human third molars were extracted and collected. As criteria, these teeth should have no cavities, no tooth wear neither restorative materials. After extraction, teeth were cleaned, and submitted to visual inspection under artificial light and magnification. After confirming the integrity of the dental crown and root, the teeth were immersed in 0.1% thymol solution at 4°C before submitting for specimen preparation.

Specimen preparation

The same operator prepared all specimens. Initially, a diamond saw (KG Sorensen, Cotia, SP, Brazil) mounted on a cutting device (Secotom, Struers, Ballerup, Denmark) was used to cut the teeth under running water at the mid-coronal level, so that flat dentin surfaces of all teeth could be exposed. After the cutting procedures, dentin surfaces were polished with wet 600-grit SiC paper (Acqua Flex, Norton, Guarulhos, SP, Brazil) for 30 seconds to generate a standardized smear layer;⁷ thereafter, each tooth was submitted to the bonding treatment according to the manufacturer's instructions. (Table 1).

Table 1. Adhesive used in this study with the composition provided by the respective manufacturer: HEMA = Hydroxyethylmethacrylate; Adper Single Bond 2 is the material name traded in South America. The same material is called Adper Single Bond Plus in the USA and Adper Scotchbond 1XT in Europe.

Name	Composition
Manufacturer	Application protocol
Adper™ Single Bond 2/Plus 3M™ ESPE™, St. Paul, MN, USA	Etching: 37% phosphoric acid gel (3M™ ESPE™, St. Paul, MN, USA) [4BT], Primer and adhesive: dimethacrylates, HEMA, polyalkenoic acid copolymer, 5 nanometer silane treated colloidal silica, ethanol, water, photo initiator Etch for 15 sec; rinse for 10 sec; blot excess water; apply 2-3 consecutive coats of adhesive for 15 sec with gentle agitation; gently air thin for 5 sec and light cure for 10 sec.

After bonding treatment, resin composite (Z250, A2 shade, 3M™ ESPE™, St. Paul, MN, USA) was incrementally built up in layers to produce blocks of six-millimeters height on the dentin surfaces. Each incremental layer (2mm) was cured under a light power density of 600mW/cm² for 20s (Curing Light XL1500, 3M™ ESPE™, St. Paul, MN, USA) according to manufacturer's instructions. Eventually, composite/tooth blocks were immersed in distilled water at 37°C for 24 hours.

The teeth were individually fixed to a sectioning block using acrylic resin. Each tooth was mounted on a hard-tissue microtome and was serially sectioned in the occlusogingival direction, producing 0.9mm thick slabs. After that, each tooth was rotated 90 degrees, and the serial sectioning was repeated. The resulting stick-shaped specimens were sectioned, free from the root. These specimens consist of resin composite in the upper half and dentin in the lower half. By means of these procedures, composite/dentin stick-shaped specimens

with cross-sectional area of approximately 0.9mm² were prepared. Consequently, a total of a hundred composite/dentin stick-shaped specimens were obtained, which were assigned randomly to two groups: Bencor Multi-T group (n=50) and Flextest group (n=50). Besides, Bencor Multi-T group and Flextest group were subdivided, respectively, into 8 and 7 subgroups, according to the number of teeth from which the stick-shaped specimens were obtained.

Microtensile bond strength test

The device used in Bencor Multi-T group and Flextest group for microtensile bond strength (μ TBS) test was respectively, Bencor Multi-T testing device and Flextest testing device. The Bencor Multi-T device (Danville Engineering Co., San Ramon, CA, USA) has already been described in other studies, and the protocols for its maneuver has also been standardized.

Flextest device (UnB, Brasília, DF, Brazil and Mitay, Cotia, SP, Brazil) is composed of a fixed lower platform with two parallel guiding bars to which a sliding upper platform is attached. The upper sliding platform is featured with roller bearings allowing it to slide up and down during microtensile test. Each platform has a cubic holding base which presents a 1.0mm width x 0.5mm of depth slot in the midst, and, on either side of the slot there are four screw holes. Besides, a metallic plate is used to cover the surface of the holding base with the slot, which is secured with four screws on either side of the slot (Figure 1).

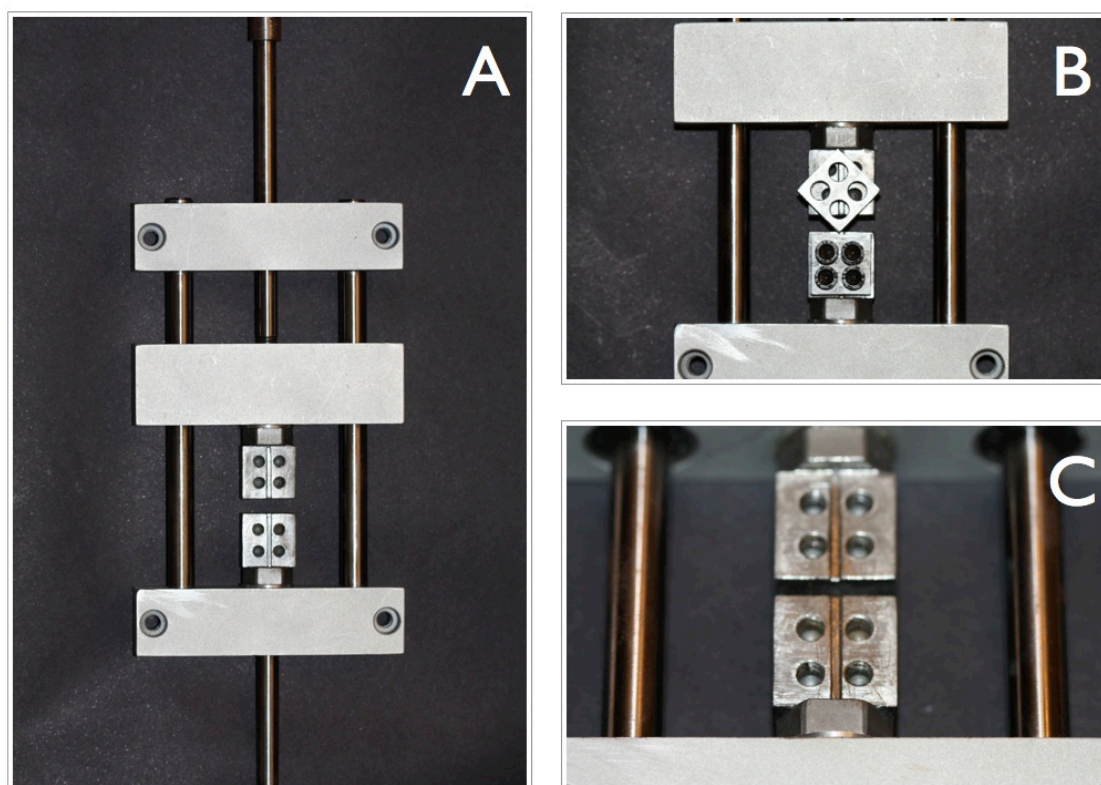


Figure 1. (A) Flextest device. The upper platform is the mobile one and the lower platform is fixed. Both of them are precisely guided by parallel bar trails. (B) Metal plate and screws attached to provide an optimized tensile distribution to all surfaces of the specimen. (C) 1mm wide and 0.5mm depth slot to accommodate the specimens. The flat surface that makes possible the mobile and fixed parts to stay in touch which is useful to perform compression tests.

The specimens of both the experimental groups were gripped onto the microtensile devices with cyanoacrylate adhesive (Superbonder Gel[®], Henkel Ltda., São Paulo, SP, Brazil). In the Bencor Multi-T group, the specimens were visually aligned, as parallel as possible to the long axis of the device. In the Flextest group, after the curing of the adhesive, the cover plate was positioned and screwed. The testing devices were connected to an universal testing machine (MTS, MTS Systems Corporation, Eden Prairie, MN, USA), which yielded a failure tension at a crosshead speed of 1.0mm/min (Figure 2). The microtensile bond strength was recorded by means of MTS-Test Star II software

(MTS Systems Corporation, Eden Prairie, MN, USA). The specimens that fractured during preparation were not included in the samples for evaluation.

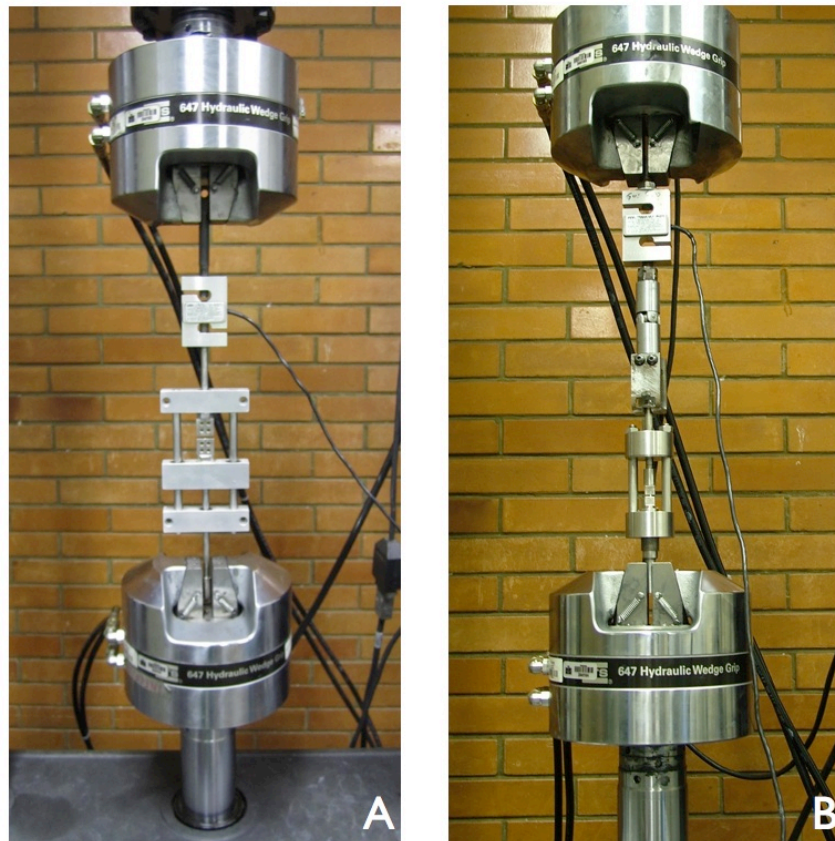


Figure 2. (A) Flextest device mounted on the MTS universal testing machine with a load cell with a nominal capacity of 100Kg. (B) Bencor Multi-T device mounted on the MTS universal testing machine with the same load cell.

After the microtensile test, each part of the specimen was carefully removed from the devices and was stored in distilled water. The cross-sectional area at the failure site was evaluated under x40 magnification with a stereoscopic microscope (Metrimex in cooperation with Pzo-Labimex, Hungary). The types of failure were classified as: Adhesive (A) - between the resin composite and the dentin; Cohesive in dentin (CD) and Cohesive in composite (CR), or mixed types, when at least two different types of failures were

observed in the same specimen. After evaluation, the frequency of each type of failure was estimated and compared.

Statistical analysis

The obtained data was evaluated by standard data distribution through the Lilliefors test. The homogeneity of variance between the two devices was evaluated by using Levene's test. Once the data was in normality and in homogeneity between the devices, it would be analysed by factorial ANOVA, followed by Fisher's tests (Least Square Difference) to investigate the intra-group averages and inter-group differences.

Furthermore, the absolute numbers of specimens were evaluated for fracture type in each of the devices, and were verified for the homogeneity of frequencies by using the Chi Square test. All tests used in this study established a level of significance at 0.05.

Results

When assessing the intra-group differences, statistically significant differences were observed in both Bencor Multi-T device ($p < 0.001$) and Flextest device ($p = 0.005$). Among the teeth submitted to Bencor Multi-T device, it was possible to verify that the tooth 4 showed significantly higher mean (58.31 ± 14.11 MPa) while the 8 tooth showed lower resistance values (20.17 ± 6.01 Mpa). The remaining teeth showed intermediate values (Table 2).

Among the teeth submitted to Flextest Device, it was found that the teeth 2, 3 and 4 showed significantly higher μ TBS values (43.47 ± 8.36 , 42.13 ± 7.76 , 42.13 ± 9.62 , respectively), followed by the teeth 6, 1, 7, and 5 (Table 2). In summary, the teeth subjected to two types of devices showed different performances.

Table 2. Intra-group comparisons: Means and standard deviations (Mpa) of bond strength between the teeth subjected to microtensile devices Bencor Multi-T and Flextest device.

Devices	Tooth	n	Mean	SD
Bencor Multi-T	1	6	26.58 cd	12.51
	2	5	30.16 cd	15.92
	3	7	48.38 ab	11.59
	4	7	58.31 a	14.11
	5	6	47.18 ab	17.88
	6	6	34.69 bc	8.17
	7	6	22.78 cd	9.12
	8	7	20.17 d	6.01
Flextest device	9	9	37.93 ab	9.63
	10	8	43.47 a	8.36
	11	6	42.13 a	7.76
	12	6	42.13 a	9.62
	13	8	29.01 c	6.73
	14	7	38.61 ab	6.67
	15	6	30.66 bc	5.92

- *Different letters indicate statistical differences between the means of the teeth of each device separately.*

Although intragroup differences exist, intergroup differences were not observed ($p > 0.05$). The average bond strength values obtained from both Bencor-Multi-T and Flextest groups were statistically equivalent (Table 3 and Fig. 3).

Table 3. Comparisons between the groups: Means and standard deviations (MPa) of bond strength of groups of teeth subjected to microtensile devices Bencor Flextest and Multi-T device.

Devices	n	Mean	SD
Bencor Multi-T	50	36.52	17.59
Flextest device	50	37.62	9.22

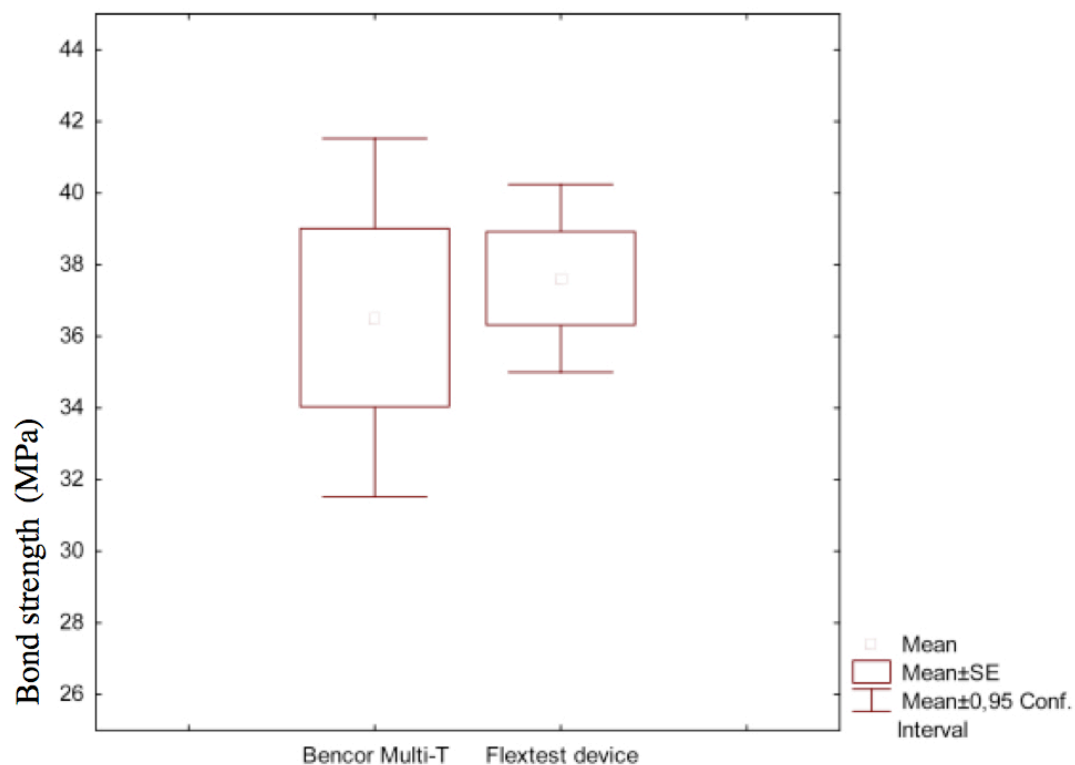


Figure 3. Means, standard errors and confidence intervals ($1.96 * SEM$) bond strength of groups of teeth subjected to microtensile devices Bencor Flextest and Multi-T device.

As for the number of specimens with different types of fractures, it was found that the two devices have provided the same frequencies and homogeneity of the types of fractures ($\chi^2=1.378$, $p=0.711$). The graphical representation is expressed in percentage (Fig. 4).

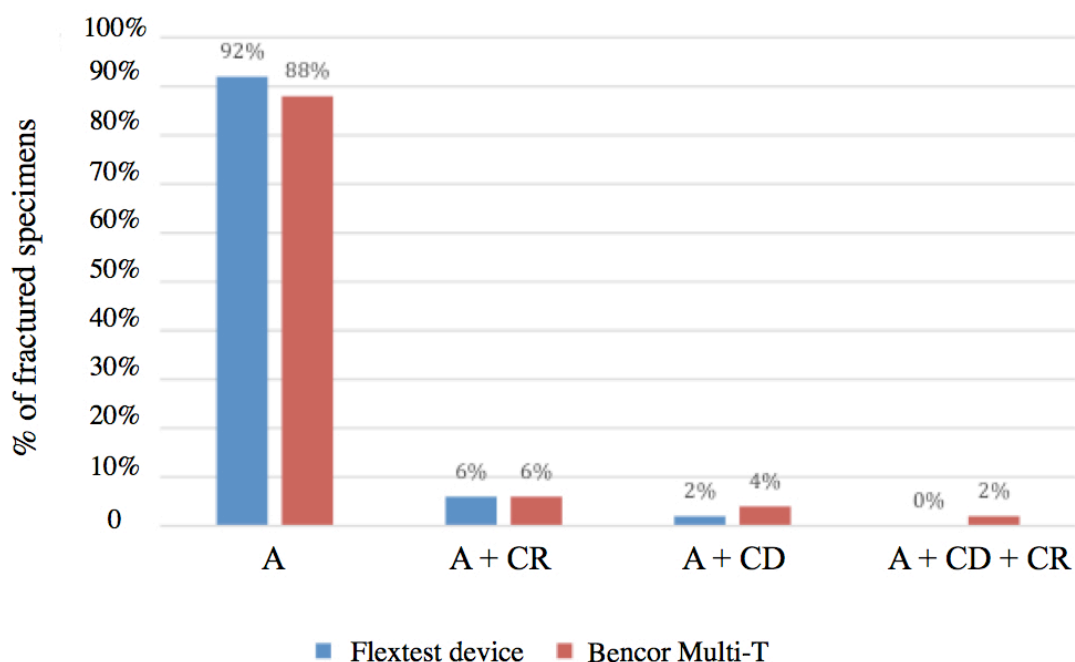


Figure 4. % of the specimens according to the various types of fracture between the Flextest device and Bencor Multi-T device. A+CR+CD = Adhesive+Cohesive in composite + Cohesive in dentin type of failure; A+CD = Adhesive+Cohesive in dentin type of failure; A+CR = Adhesive+Cohesive in composite type of failure; A = adhesive type of failure.

Discussion

Since the introduction of μ TBS test by Sano *et al.*¹ up until now, the use of the hourglass shape and stick-shaped specimens for the test has been broadly accepted,⁸⁻¹¹ however there is no consensus or protocol concerning the testing device that can be considered as the golden standard. In this context, Flextest device was designed with the main purpose of yielding more uniform tensile force distribution and, secondly, to serve as a multi-task device. In the present study, Bencor Multi-T device was chosen as a control due to its broad acceptance in the literature.

In the intra-group comparisons, according to the obtained statistical data, the pattern of performance for Bencor Multi-T device was a little more irregular in comparison to the Flextest device; however, this slight difference probably could not be substantiated in practice. It should emphasize that the intra-group variation observed in the Bencor Multi-T group did not invalidate the confidence in the performance of the Bencor Multi-T device. With this outcome, the intra-group variation observed among the mean μ TBS values of each tooth in Flextest group could not invalidate this device either.

The slightly better outcome of Flextest group may be likely attributed to the structural improvement added in the new device. With regard to the physical structure of Flextest device, the two guiding bars are aids to ensure the alignment and precise vertical upward and downward sliding of the upper platform. According to this principle, a moment-free bending would be expected, and pure vertical load would be provided. Besides, with regard to the holding base, the specimen could be attached in a slot with adhesive and was covered by a metallic plate in order to distribute uniformly the tensile force to all directions. An increase of attached surfaces of the specimen to the device may improve a better distribution of tensile forces.⁴ These assumptions were not proved in this study. Further finite element method studies could be performed to check these hypotheses.

When the intergroup comparison was performed, no significant difference was observed between Flextest and Bencor Multi-T group. This finding showed that Flextest device presented a good performance. In the present study, a lower standard deviation was evidenced in the Flextest group in comparison to

the Bencor Multi-T group. However, this finding is not unanimous in the literature because other studies with Bencor Multi-T device showed similar or even lower standard deviation values in comparison to the data obtained in Flextest group.¹²⁻¹⁵

Several studies have been reported the mean μ TBS values, similar to those obtained in the present study.^{2,12,16-18} According to the obtained data, it can be assumed that both devices attained reasonable mean μ TBS values as they were not the lowest neither the highest values. It should emphasize that not only gripping devices can influence on the μ TBS test results. For instance, the cross-sectional areas of the specimens used in this study were small, approximately 0.9mm^2 , and tensile bond strength is inversely related to bonded surface area.¹⁹ Thus, it is not the scope of this study to discuss the merit of the different values observed in the literature in comparison to the present study, but to show the similarity of the results provided by two devices when the tests were performed under similar conditions.

Concerning to the types of failure, Raposo *et al.*²⁰ showed that a significant association exists between type of failure and gripping devices ($p < 0.0001$). In the present study, this finding was not observed. Both devices predominantly presented similar type of failure, which was adhesive type, 88% and 92% for Bencor Multi-T and Flextest group, respectively. Cohesive failure alone was not observed which corroborated with the statement that microtensile test provokes less cohesive failures. This fact probably implies that the cohesive strength between dentin and composite is stronger than the adhesive strength. The mixed-typed failures also occurred similarly to both groups.

The results attained by Flextest device showed that this device could be used for μ TBS testing with high reproducibility and similarity to the Bencor Multi-T device. Although new features were added to offer correct distribution of the tensile forces and to consequently avoid undesirable mechanical loads, the cost for production of this device is still competitive. In addition, the flat surfaces of the holding bases facilitate them to be in contact for the purpose of the execution of compression tests.

The Flextest device provided high reliable and reproducible microtensile bond strength testing performance, which showed similar mean μ TBS values in comparison to the Bencor Multi-T group. The type of failures found in both groups was the adhesive type.

The Authors declares that there is no conflict of interest

This research received no specific grant from any funding agency in the public, commercial, or not-for-profit sect

References

1. Sano H, Ciucchi B, Matthews WG, Pashley DH. Tensile properties of mineralized and demineralized human and bovine dentin. *J Dent Res* 1994; 73: 1205–11.
2. Garcia FCP, D'Alpino PHP, Terada RSS, Carvalho RM. Testes mecânicos para a avaliação laboratorial da união resina-dentina. *Rev Fac Odontol Bauru*. 2002; 10: 118-27.
3. Reis A, Carrilho MRO, Schroeder M, Tancredo LLF, Loguercio AD. The influence of storage time and cutting speed on microtensile bond strength. *J Adhes Dent*. 2004; 6: 7-11.
4. Soares CJ, Soares PV, Santos-Filho PCF, Armstrong SR. Microtensile specimen attachment and shape - finite element analysis. 2008; 87: 89-93.
5. Botta AC, Salvia ACRD, Júnior LN, Pavanelli CA, Pagani C. Influence of different devices on microtensile strength. *Braz Dent Sci*. 2009; 12: 34-9.
6. Perdigão J, Geraldeli S. Bonding characteristics of self-etching adhesives to intact versus prepared enamel. *J Esthet Restor Dent*. 2003; 15: 32-4.
7. Pashley DH, Tao L, Boyd L, King GE, Horner JA. Scanning electron microscopy of the substructure of smear layers in human dentine. *Arch Oral Biol* 1988; 33: 265–70.
8. Tay FR, Carvalho RM, Yiu CK, King NM, Zhang Y, Agee K, Bouillaguet S, Pashley DH. Mechanical disruption of dentin collagen fibrils during resin-dentin bond testing. *J Adhes Dent*. 2000 Autumn; 2: 175-92.
9. Shono Y, Ogawa T, Terashita M, Carvalho RM, Pashley EL, Pashley DH. Regional measurement of resin-dentin bonding as an array. *J Dent Res*. 1999; 78: 699-705.
10. Cardoso PE, Sadek FT, Goracci C, Ferrari M. Adhesion testing with the microtensile method: effects of dental substrate and adhesive system on band strength measurements. *J Adhes Dent*. 2002 Winter; 4: 291-7.
11. Hass V, Dobrovolski M, Zander-Grande C, Martins GC, Gordillo LA, Rodrigues Accorinte Mde L, Gomes OM, Louguercio AD, Reis A. Correlation between degree of conversion, resin-dentin bond strength and nanoleakage of simplified etch-and-rinse adhesives. *Dent Mater*. 2013; 29: 921-8.

12. Toledano M, Osorio R, Albaladejo A, Aguilera FS, Tay FR, Ferrari M. Effect of cycling loading on the microtensile bond strengths of total-etch and self-etch adhesives. *Oper Dent*, 2006; 31: 25-32.
13. Toledano M, Osorio R, Ceballos L, Fuentes MV, Fernandes CAO, Tay FR, Carvalho RM. Microtensile bond strength of several adhesive systems to different dentin depths. *Am J Dent*. 2003; 16: 292-8.
14. Silva ALF, Lima DANL, Souza GMD, Santos CTD, Paulillo LAMS. Influence of additional adhesive application on the microtensile bond strength of adhesive systems. *Oper Dent*, 2006; 31: 562-68.
15. Reis AF, Oliveira MT, Giannini M, De Goes MF, Rueggerberg FA. The effect of organic solvents on one-bottle adhesives` bond strength to enamel and dentin. *Oper Dent*, 2003; 28: 700-06.
16. Garcia FCP, Almeida JCF, Osorio R, Carvalho RM, Toledano M. Influence of drying time and temperature on bond strength of contemporary adhesives to dentine. *J Dent*. 2009; 37:315-20.
17. Shono Y, Terashita M, Pashley EL, Brewer PD, Pashley DH. Effects of cross-sectional area on resin-enamel tensile bond strength. *Dent Mater*, 1997; 13: 290-6.
18. Shono Y, Terashita M, Shimada J, Kozono Y, Carvalho RM, Russel CM, Pashley DH. Durability of resin-dentin bonds. *J Adhesive Dent*, 1999; 1: 211-8.
19. Sano H, Shono T, Sonoda H, Takatsu T, Ciucchi B, Carvalho R, Pashley DH. Relationship between surface area for adhesion and tensile bond strength-evaluation of a micro-tensile bond test. *Dent Mater* 1994; 10: 236-240.
20. Raposo LH, Armstrong SR, Maia RR, Qian F, Geraldeli S, Soares CJ. Effect of specimen gripping device, geometry and fixation method on microtensile bond strength, failure mode and stress distribution: laboratory and finite element analyses. *Dent Mater*. 2012 May;28: e50-62.

