

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DA DENTINA HUMANA E BOVINA

Roberto Pizarro Sanches², Alessandra Daniela Ferraz Campos², Airton Abrahão Martin², Luís Eduardo Silva Soares^{1,2}

¹UNIVAP/FCS - Odontologia, Av. Shishima Hifumi, 2911, Urbanova, São José dos Campos, SP, Brasil, lesoares@univap.br

²UNIVAP/IP&D – Laboratório de Espectroscopia Vibracional Biomédica, Av. Shishima Hifumi, 2911, Urbanova, São José dos Campos, SP, Brasil, amartin@univap.br

Resumo - As características do esmalte e da dentina devem ser observadas quando se substitui dentes humanos por dentes bovinos em estudos *in vitro*. O objetivo deste estudo *in vitro* foi avaliar em nível molecular, as diferenças químicas entre os componentes da dentina humana e bovina. Foram preparados 10 terceiros molares humanos erupcionados hígidos (H) e 10 incisivos bovinos (B) expondo a superfície da dentina. Cada amostra foi analisada por espectroscopia FT-Raman. Seis picos do espectro Raman foram avaliados calculando-se a área relativa (p1-p3: inorgânico; p4-p6: orgânico). A dentina bovina difere significativamente da dentina humana nas áreas dos picos dos componentes inorgânicos e orgânicos (P<0.0001). Entretanto, novos estudos da interação da dentina bovina e sistemas adesivos devem ser realizados.

Palavras-chave: dentina bovina, dentina humana, espectroscopia FT-Raman.

Área do Conhecimento:

Introdução

As características dos tecidos dentais são os principais fatores a serem observados quando se analisa a possibilidade de substituir os dentes humanos por dentes bovinos em estudos *in vitro*. Como alternativa para a utilização de dentes humanos, incisivos permanentes de bovinos são utilizados para testes de adesividade (IKEMURA et al., 2003; LOPES et al., 2003; MIYAZAKI et al., 2003; CENCI et al., 2004; HELVATJOGLU-ANTONIADES et al., 2004; SATO et al., 2005).

Algumas propriedades e características da dentina humana e bovina são similares. Estudos anatômicos e histoquímicos comparativos revelaram que todos os dentes de mamíferos são similares. Existem preocupações se os resultados obtidos em experimentos animais podem ser estendidos para os dentes humanos e em situações clínicas. Entretanto, os comitês de ética ao redor do mundo têm estimulado a substituição de dentes humanos por dentes de animais (FONSECA et al., 2004). Considerando estes fatores, as informações sobre a composição química de dentes humanos e bovinos são importantes para entender melhor a interação destes substratos com os sistemas adesivos.

Os estudos das características e propriedades de dentes humanos e animais apresentam resultados morfológicos e histoquímicos obtidos por técnicas tradicionais. Estas técnicas necessitam de preparações específicas das amostras e não permitem a utilização da mesma amostra em outras análises.

Uma alternativa para as técnicas tradicionais é a espectroscopia Raman. Esta técnica permite a análise estrutural de amostras por identificar as vibrações das moléculas das amostras. Os modos vibracionais dos componentes minerais e orgânicos podem ser identificados e as intensidades relativas das bandas referentes a estes componentes podem ser calculadas permitindo a avaliação semiquantitativa destes constituintes (PENEL et al., 1998; STEINER-OLIVEIRA et al., 2006). A principal vantagem da espectroscopia Raman comparada com outras técnicas analíticas é a possibilidade de obter informações dos componentes dos dentes sem destruir a amostra (SOARES et al., 2007). O objetivo deste estudo *in vitro* foi, avaliar em nível molecular, as diferenças químicas entre os componentes da dentina humana e bovina.

Metodologia

Este trabalho foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa da UNIVAP (L087/2005/CEP). Dez dentes terceiros molares humanos erupcionados e hígidos e dez incisivos bovinos foram selecionados para este estudo. Os dentes humanos foram obtidos de pacientes que necessitavam de extrações dentárias como parte do tratamento odontológico na clínica de Odontologia da UNIVAP e os dentes bovinos foram retirados de mandíbulas bovinas.

Todas as amostras foram armazenadas em soro fisiológico (Aster Produtos Médicos LTDA, Sorocaba, SP, Brasil) a 9°C até a utilização. Após

a extração dos dentes humanos e bovinos, o tecido mole foi removido com o auxílio de curetas periodontais (7/8; Duflex, Rio de Janeiro, RJ, Brasil). Os dentes limpos foram polidos com pasta de pedra pomis e água (S. S. White, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) utilizando uma escova de Robinson (Viking – KG Sorensen, Barueri, SP, Brasil) em baixa rotação e refrigeração (KaVo do Brasil SA, Joinville, SC, Brasil). Após o polimento, os dentes humanos e bovinos foram armazenados em solução aquosa de Timol a 0,1% por uma semana em geladeira. Para preparar as amostras, os dentes foram lavados em água corrente por 24 horas para a remoção de resíduos de Timol (SOARES et al., 2007).

A coroa dos dentes humanos foi seccionada no primeiro terço oclusal perpendicularmente ao longo eixo do dente utilizando um disco diamantado refrigerado com uma velocidade de 250 rpm e um peso de 100g montado em uma máquina de corte (Isomet 1000 – BUEHLER, Lake Bluff, IL, EUA). Em seguida a superfície da dentina foi polida com uma lixa de papel de granulação fina (nº 600 Norton, São Paulo, SP, Brasil) montada em uma politriz com uma velocidade de 150 rpm (Knuth Rotor – Struers, Brasil). Este polimento foi realizado por 1 minuto para produzir uma camada de *smear layer* padrão (STEINER OLIVEIRA 2006 et al., SOARES et al., 2007). As raízes dos dentes foram removidas após o polimento utilizando um disco de diamante montado em máquina de corte produzindo um disco de dentina para cada dente.

Para a preparação das amostras de dentes bovinos, o esmalte vestibular foi removido por um corte longitudinal paralelo ao longo do eixo do dente utilizando um disco diamantado refrigerado com uma velocidade de 250 rpm e um peso de 100g montado em uma máquina de corte. O polimento para a produção da camada de *smear layer* foi realizado de modo semelhante aos dentes humanos.

Para a análise por espectroscopia Raman, um espectro por dente foi coletado pelo espectrômetro FT-Raman (RFS 100 – Bruker Inc., Karlsruhe, Alemanha). As amostras foram excitadas pelo laser de Nd:YAG ($\lambda = 1064.1\text{nm}$) e a potência incidente na amostra foi de 100mW. A resolução espectral selecionada foi de 4 cm^{-1} e para cada medida, um espectro foi acumulado com 100 scans (STEINER-OLIVEIRA et al., 2006; SOARES et al., 2007).

Para a análise espectral qualitativa e semiquantitativa, os espectros passaram por uma correção da linha de base e então foram normalizados com relação ao pico em 960 cm^{-1} (KO et al., 2005). No espectro Raman da dentina seis áreas foram avaliadas: componente mineral - $365\text{--}488\text{ cm}^{-1}$ (p1), $520\text{--}650\text{ cm}^{-1}$ (p2), $995\text{--}1120\text{ cm}^{-1}$ (p3) e componente orgânico - $1215\text{--}1365\text{ cm}^{-1}$

$1215\text{--}1365\text{ cm}^{-1}$ (p4), $1366\text{--}1502\text{ cm}^{-1}$ (p5), $1580\text{--}1735\text{ cm}^{-1}$ (p6). As áreas integradas dos picos foram calculadas pelo software Matlab (The MathWorks, Inc., Natick, MA, EUA).

A análise estatística das áreas integradas das amostras de dentes humanos e bovinos obtidas através dos espectros Raman foi realizada no programa InStat (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA) no qual foi aplicado o teste t não pareado.

Resultados

Os espectros Raman característicos da dentina humana e bovina apresentam os mesmos modos vibracionais para os conteúdos orgânicos e inorgânicos na região entre $300\text{--}1200\text{ cm}^{-1}$ e $1200\text{--}1800\text{ cm}^{-1}$ (Figuras 1 e 2, respectivamente).

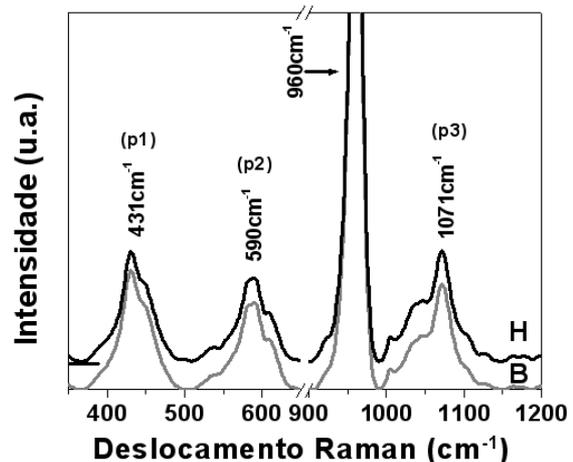


Figura 1 – Espectro Raman dos componentes inorgânicos da dentina humana (H) e bovina (B).

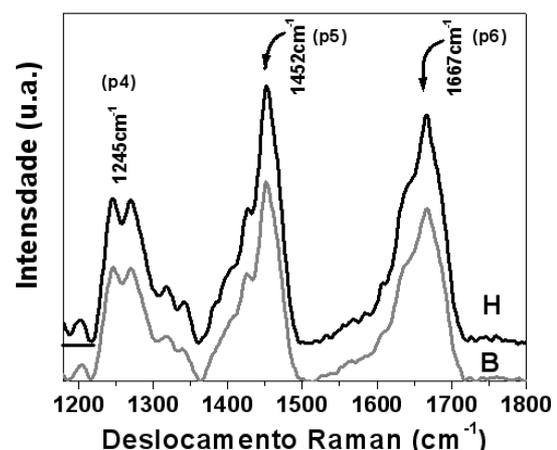


Figura 2 – Espectro Raman dos componentes orgânicos da dentina humana (H) e bovina (B).

Na figura 1, o pico mais intenso em 960 cm^{-1} é referente ao modo vibracional do componente fosfato da hidroxiapatita ($\text{PO}_4^{3-} \nu_1$) da dentina e o

pico localizado em 1071cm^{-1} é referente ao modo vibracional do carbonato ($\text{CO}_3^{2-} \nu_1$).

Os picos com deslocamento Raman em 431 e 590cm^{-1} são relacionados aos modos vibracionais do fosfato ($\text{PO}_4^{3-} \nu_2$ e $\text{PO}_4^{3-} \nu_4$). Na figura 2, os picos localizados em 1245 , 1452 e 1667cm^{-1} são relacionados aos componentes orgânicos (amida III, vibrações CH_2 e amida I ($\text{C}=\text{O}$), respectivamente). Os resultados dos testes estatísticos das áreas integradas dos picos Raman mostram diferenças estatísticas significantes entre os dentes humanos e bovinos com relação aos componentes orgânicos e inorgânicos da dentina ($P < 0.0001$) (Tabela 1).

Tabela 1 - Valores da média e desvio padrão (DP) das áreas integradas. Picos de conteúdo mineral (p1 – p3) e picos orgânicos (p4 – p6) para dentes humanos (H) e bovinos (B).

Grupo	P1	P2	P3	P4	P5	P6
H	3.5* (0.2)	2.8* (0.2)	3.8* (0.2)	2.0* (0.2)	2.7* (0.2)	2.6* (0.2)
B	3.8* (0.1)	3.0* (0.1)	3.5* (0.1)	1.6* (0.3)	2.1* (0.4)	2.0* (0.3)

*Asterisco indica diferença estatística significativa ($P < 0.0001$) entre os componentes dos dentes humanos e bovinos (teste t não pareado).

As áreas integradas dos picos p1 e p2 relacionadas aos modos vibracionais do fosfato nas amostras bovinas são maiores do que nas amostras de dentina humana ($P < 0.0001$).

As áreas integradas dos picos p3, p4, p5 e p6 relacionadas aos modos vibracionais do carbonato e colágeno, respectivamente, são maiores nos dentes humanos do que nos dentes bovinos ($P < 0.0001$).

Discussão

Este estudo apresentou os resultados da caracterização em nível molecular dos componentes químicos da dentina humana e bovina e as diferenças entre os componentes orgânicos e inorgânicos da dentina entre os substratos.

Nenhum estudo anterior avaliou cada modo vibracional dos componentes da dentina humana e bovina. Foram realizados apenas estudos histoquímicos, anatômicos, morfológicos e ensaios mecânicos de tração comparando os substratos (CHERSONI et al., 2004; WANG et al., 2004; NAKAOKI et al., 2005). Esta caracterização vibracional é importante devido ao crescente

aumento na utilização de dentes de animais em estudos científicos em substituição aos dentes humanos.

A análise estatística dos resultados mostrou que os substratos são diferentes na quantidade relativa de componentes orgânicos e inorgânicos (Tabela 1).

Na dentina humana foi observada uma área relativa estatisticamente maior do componente carbonato (1071cm^{-1}) e uma área relativa menor do componente fosfato (431cm^{-1} e 590cm^{-1}) comparado com a dentina bovina ($P < 0.0001$).

A área integrada dos picos em 1245 , 1452 e 1667cm^{-1} relativas aos componentes orgânicos amida III, vibrações CH_2 e amida I foi maior nas amostras de dentes humanos do que nos dentes bovinos ($P > 0.0001$).

Estas diferenças nas quantidades relativas dos componentes orgânicos e inorgânicos são provavelmente devidas ao fato de que a dentina nos dentes bovinos apresenta túbulos dentinários mais largos e mais porosos na dentina intertubular quando comparados com dentes humanos (LOPES et al., 2003).

A dentina humana madura contém mais carbonato do que o esmalte (5-8 % em peso) (PENEL et al., 1998). O mineral na dentina humana é a apatita carbonatada e está localizada nos espaços entre as moléculas de colágeno (intrafibrilar) ou aderidas nas fibras colágenas (extrafibrilar) (HAEBELITZ et al., 2002). Este fato é importante porque a matriz de colágeno é o componente principal na adesão à dentina condicionada.

Neste trabalho, a informação direta com relação aos componentes químicos da dentina humana e bovina foi obtida através da espectroscopia FT-Raman. A originalidade deste estudo é atribuída à caracterização vibracional de componentes orgânicos e inorgânicos dos dois tipos de dentina.

Conclusão

A dentina bovina difere significativamente da dentina humana nas áreas dos picos dos componentes inorgânicos e orgânicos. Entretanto, novos estudos da interação da dentina bovina e sistemas adesivos devem ser realizados.

Agradecimentos

Os autores agradecem a Walter Andrés Avendaño Jará pela análise dos dados no MatLab. Este trabalho foi apoiado pela FAPESP (01/14384-8) e CNPq (302393/2003-0).

Referências

- CENCI, M.S., PIVA, E., POTRICH, F., FORMOLO, E., DEMARCO, F.F., POWERS, J.M. Microleakage in bonded amalgam restorations using different adhesive materials. **Braz. Dent. J.** V.15, p.13-18, 2004.
- CHERSONI, S., SUPPA, P., GRANDINI, S., GORACCI, C., MONTICELLI, F., YIU, C., HUANG, C., PRATI, C., BRESCHI, L., FERRARI, M., PASHLEY, D.H., TAY, F.R. In vivo and in vitro Permeability of One-step Self-etch Adhesives. **J. Dent. Res.** V.83, p.459-464, 2004.
- FONSECA, R.B., HAITER-NETO, F., FERNANDES-NETO, A.J., BARBOSA, G.A.S., SOARES, C.J. Radiodensity of enamel and dentin of human, bovine and swine teeth. **Arch. of Oral Biol.** V.49, p. 919-922, 2004.
- HAEBELITZ, S., BALOOCH, M., MARSHALL, S.J., BALOOCH, G., MARSHALL, JR. G.W. In situ atomic microscopy of partially demineralized human dentin collagen fibrils. **J. Struct. Biol.** V.138, p.227-236, 2002.
- HELVATJOGLU-ANTONIADES, M., KOLINIOTOU-KUBIA, E., IONYSSOPOULOS, P. The effect of thermal cycling on the bovine dentine shear bond strength of current adhesive systems. **J. Oral Rehabil.** V.31, p. 911-917, 2004.
- IKEMURA, K., TAY, F.R., HIRONAKA, T., ENDO, T., PASHLEY, D.H. Bonding mechanism and ultrastructural interfacial analysis of a single-step adhesive to dentin. **Dent. Mater.** V.19, p. 707-715, 2003.
- KO, AC-T., CHOO-SMITH, L-P., HEWKO, M., LEONARDI, L., SOWA, M.G., DONG, C.C.S., WILLIAMS, P., CLEGHORN, B. Ex vivo detection and characterization of early dental caries by optical coherence tomography and Raman spectroscopy. **J. Biomed. Opt.** V.10, p.1-16, 2005.
- LOPES, M.B., SINHORETI, M.A.C., SOBRINHO, L.C., CONSANI, S. Comparative study of the dental substrate used in shear bond strength tests. **Pesqui. Odontol. Bras.** V.17, p. 171-175, 2003.
- MIYAZAKI, M., ONOSE, H., IIDA, N., KAZAMA, H. Determination of residual double bonds in resin-dentin interface by Raman spectroscopy. **Dent. Mater.** V.19, p. 245-251, 2003.
- NAKAOKI, Y., SASAKAWA, W., HORIUCHI, S., NAGANO, F., IKEDA, T., TANAKA, T., INOUE, S., UNO, S., SANO, H., SIDHU, S.K. Effect of double-application of all-in-one adhesives on dentin bonding. **J. Dent.** V. 33, p. 765-772, 2005.
- PENEL, G., LEROY, G., REY, C., BRES, E. MicroRaman spectral study of the PO₄ and CO₃ vibrational modes in synthetic and biological apatites. **Calcif. Tissue Int.** V. 63, p. 475-481, 1998.
- SATO, M., MIYAZAKI, M. Comparison of depth of dentin etching and resin infiltration with single-step adhesive systems. **J. Dent.** V.33, p. 475-484, 2005.
- STEINER-OLIVEIRA, C., RODRIGUES, L.K.A., SOARES, L.E.S., MARTIN, A.A., ZECELL, D.M., NOBRE-DOS-SANTOS, M. Chemical, morphological and thermal effects of 10.6-mm CO₂ laser on the inhibition of enamel demineralization. **Dent. Mater. J.** V.25, p.455-462, 2006.
- WANG, Y., SPENCER, P. Physicochemical interactions at the interfaces between self-etch adhesive systems and dentine. **J. Dent.** V.32, p. 567-579, 2004.