

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA – DOUTORADO  
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: CLÍNICA INTEGRADA**

**LUISA FERNANDA ALEGRIA ACEVEDO**

**AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES BIOLÓGICAS E FÍSICAS DE BIOVIDROS  
EXPERIMENTAIS PARA O TRATAMENTO DA HIPERSENSIBILIDADE  
DENTINARIA CERVICAL: ESTUDO IN VITRO E IN VIVO**

**PONTA GROSSA  
2020**

**LUISA FERNANDA ALEGRIA ACEVEDO**

**AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES BIOLÓGICAS E FÍSICAS DE BIOVIDROS  
EXPERIMENTAIS PARA O TRATAMENTO DA HIPERSENSIBILIDADE  
DENTINÁRIA CERVICAL: ESTUDO IN VITRO E IN VIVO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação *Stricto sensu* em Odontologia da Universidade Estadual de Ponta Grossa, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Odontologia, área de concentração em Clínica Integrada, linha de pesquisa de Propriedades Etiologia, Diagnostico e Tratamento das Doenças Bucais.

Orientador: Prof. Dr. Fábio André Dos Santos

**PONTA GROSSA**

**2020**

Alegria Acevedo, Luisa Fernanda  
A366 Avaliação das propriedades biológicas e físicas de biovidros experimentais para o tratamento da hipersensibilidade dentinária cervical: estudo in vitro e in vivo / Luisa Fernanda Alegria Acevedo. Ponta Grossa, 2020.  
88 f.

Tese (Doutorado em Odontologia - Área de Concentração: Clínica Integrada), Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientador: Prof. Dr. Fabio André Dos Santos.

1. Vidro. 2. Teste de biocompatibilidade. 3. Permeabilidade da dentina. 4. Estrôncio. 5. Potásio. I. Dos Santos, Fabio André. II. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Clínica Integrada. III.T.

CDD: 617.6



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA  
Av. General Carlos Cavalcanti, 4748 - Bairro Uvaranas - CEP 84030-900 - Ponta Grossa - PR - <https://uepg.br>

## **TERMO**

**LUISA FERNANDA ALEGRIA ACEVEDO**

### **AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES BIOLÓGICAS E FÍSICAS DE BIOVIDROS EXPERIMENTAIS PARA O TRATAMENTO DA HIPERSENSIBILIDADE DENTINÁRIA CERVICAL: ESTUDO IN VITRO E IN VIVO**

Tese apresentada como pré-requisito para a obtenção do título de Doutor na Universidade Estadual de Ponta Grossa, no Curso de Doutorado em Odontologia – Área de concentração em Clínica Integrada.

Ponta Grossa, 13 de Março de 2020

Prof. Dr. Fábio André Dos Santos – Orientador  
Universidade estadual de Ponta Grossa

Prof. Dr. Francisco Serbena – Membro da Banca Examinadora  
Universidade estadual de Ponta Grossa

Profa. Dra. Shelon Costa Souza – Membro da Banca Examinadora  
Universidade estadual de Ponta Grossa

Prof. Dr. Adolfo Contreras Rengifo – Membro da Banca Examinadora  
Universidad del Valle - Colômbia

Prof. Dr. Carlos Augusto Nassar – Membro da Banca Examinadora  
UNIOESTE - Cascavel



Documento assinado eletronicamente por **Fabio Andre dos Santos, Professor(a)**, em 15/02/2021, às 14:01, conforme art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



A autenticidade do documento pode ser conferida no site <https://sei.uepg.br/autenticidade> informando o código verificador **0409364** e o código CRC **81DF135C**.

## DADOS CURRICULARES

### LUISA FERNANDA ALEGRIA ACEVEDO

NASCIMENTO	19.06.1985 Santiago de Cali - Colômbia
FILIAÇÃO	Maria Isabel Acevedo Castañeda Hannover Victoriano Alegria López
2002 – 2007	Curso de Graduação em Odontologia da Universidad Santiago de Cali (USC). Santiago de Cali – Colômbia.
2014 – 2016	Curso de Pós-graduação em Odontologia, Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG), nível de Mestrado em Odontologia - Área de Concentração em Clínica Integrada.
2016 –	Curso de Pós-graduação em Odontologia, Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG), nível de Doutorado em Odontologia - Área de Concentração em Clínica Integrada.

*Dedico esta tese de doutorado primeiramente a **Deus**,  
Meus pais, **Isabel** e **Victor**, aos meus  
Irmãos, **Ivonne** e **Gustavo** e ao  
Meu noivo **Juan David**.*

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Programa de Pós-Graduação Stricto sensu em Odontologia da Universidade Estadual de Ponta Grossa, pela oportunidade de cursar o Doutorado.

Ao meu orientador o Prof. Dr. Fábio André Dos Santos, por sua orientação no desenvolvimento e execução deste trabalho. Agradeço seus conselhos e admiro sua dedicação à docência e à pesquisa.

Aos Professores do Programa de Pós-Graduação Stricto sensu em Odontologia, por compartilhar seus conhecimentos, pela guia e ajuda que brindam aos alunos e por mostrar sempre uma boa disposição para resolver as dúvidas que sempre surgem no processo de aprendizagem.

Aos meus colegas de Mestrado e da Universidade Estadual de Ponta Grossa: Leticia, Ana, Mariane e Daniella, pela amizade e pelos conselhos, parceria, companhia e troca de conhecimentos ao longo do curso.

Aos meus colegas e amigos estrangeiros Felipe Gutierrez, Andrés Montenegro, Maria Lujan Mendez, Jorge Bermudez, Andrés Dávila e Alejandra Nuñez, pela amizade incondicional, pelos momentos compartilhados, pelo seu apoio durante o curso, por ser minha família no Brasil, sempre estarão num lugar especial do meu coração.

Ao Professor Doutor Francisco Carlos Seberna e ao MSc Iolanda Cristina Justus Dechandt, pelo fornecimento dos biovidros experimentais e pelas contribuições e orientações durante o desenvolvimento do trabalho.

Ao MSc Renato Luiz Siqueira e ao Professor Dr. Edgar Dutro Zanotto do laboratório de materiais vítreos (LaMAV/UFSCar) pelo fornecimento das amostras de Biosilicato e do vidro 45S5.

Ao complexo de Laboratório Multiusuários (C-LABMU) da Universidade Estadual de Ponta Grossa pelo apoio técnico durante a execução da pesquisa.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pela bolsa de estudos concedida durante o curso.



A Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)  
pelo apoio e investimento ao desenvolvimento da pesquisa.

## RESUMO

ALEGRIA-ACEVEDO LF. Avaliação das propriedades biológicas e físicas de biovidros experimentais para o tratamento da hipersensibilidade dentinária cervical: estudo *in vitro* e *in vivo*. [Tese – Doutorado em Odontologia – Área de Concentração Clínica Integrada - Universidade Estadual de Ponta Grossa; 2020].

**Objetivos:** Os objetivos deste trabalho foram avaliar as propriedades biológicas, mecânicas/físicas *in vitro* e *in-vivo* de biovidros experimentais do sistema  $2\text{Na}_2\text{O}.1\text{CaO}.3\text{SiO}_2+6\%\text{P}_2\text{O}_5$  contendo Sr e K, como alternativa terapêutica para o tratamento da hipersensibilidade dentinária cervical (HD). **Material e métodos:** três biovidros experimentais (BvSr, BvK, BvSRK) foram sintetizados pelo método de fusão e posteriormente foram moídos; obtendo assim partículas na faixa de micrometros. O estudo foi dividido em três experimentos: 1). Foi avaliado o potencial efeito citotóxico nos períodos de 24 e 48 h na viabilidade e a morfologia usando dois tipos de células, linhagem NIH/3T3 e linhagem primária de células de polpa humana (CIPH), e foi usado o extrato do biovidro nas concentrações de 5, 50, 100, 500, 1000, 5000 e 10000 µg/mL. Foi avaliado o efeito da aplicação dos biovidros na superfície da dentina bovina nos parâmetros de microdureza superficial (MD), rugosidade superficial (RS), a capacidade de obliteração dos tubúlos dentinários estudando a permeabilidade dentinária (PD), análise da presença dos biovidros por microscopia eletrônica de varredura por efeito de campo (FEG) e análise da composição iônica por espectrometria de energia dispersiva de raio X (EDS); esse parâmetros foram avaliados nos corpos de dentina inicial (sem tratamento), após EDTA, após 24 h de tratamento e após escovação. 3). Foi estudado o efeito da aplicação dos biovidros na superfície dentinária (*in vivo*) em modelo de recessão gengival animal, após eutanásia dos animais se verificou a capacidade de adesão a superfície dentinária por FEG e a presença dos íons dos materiais por meio EDS. **Resultados:** Todos o biovidros mantiveram a viabilidade celular nas concentrações mais baixas e nas concentrações de 5000 e 10000 mg/mL apresentaram citotoxicidade em comparação com o DMEM. Nos testes físicos/mecânicos na dentina, se observou que os materiais tiveram a capacidade de manter ou aumentar a MD e a RS, e capacidade de reduzir a PD. Nas microfotografias (FEG) se visualizou a capacidade de adesão à superfície dentinária e no (EDS) se verificou a presença dos diferentes íons característicos de cada material. No modelo de recessão gengival animal foi possível verificar a capacidade de adesão dos materiais em condições orais mais próximas da realidade clínica. **Conclusão:** todos os biovidros apresentaram bicompatibilidade na cultura celular, capacidade de obliterar os túbulos, remineralizar a dentina *in vivo* e *in vitro*.

**Palavras-chave:** Vidro, teste de biocompatibilidade, sensibilidade da dentina, permeabilidade da dentina, estrôncio, potássio.

## ABSTRACT

ALEGRIA-ACEVEDO LF. Evaluation of the biological and physical properties of experimental bioactive glasses for the treatment of cervical dentinal hypersensitivity: in vitro and in vivo study. [Thesis – Doctorate Degree in Dentistry – Concentration Area: Integrated Clinic - State University of Ponta Grossa; 2020]

**Objectives:** The objective of this work was to evaluate the in vitro and in vivo biological, mechanical and in vivo properties of  $2\text{Na}_2\text{O} \cdot 1\text{CaO} \cdot 3\text{SiO}_2 + 6\% \text{P}_2\text{O}_5$  experimental bioglass containing Sr and K as a therapeutic alternative for the treatment of cervical dentin hypersensitivity (DH). **Methods:** Three experimental biovessels (BvSr, BvK, BvSRK) were synthesized by the fusion method and were subsequently milled; thus obtaining particles in the micrometer range. The study was divided in three experiments: 1). The potential cytotoxic effect in the 24 and 48 h periods in viability and the morphology using two cell types, NIH / 3T3 line and primary human pulp cell line (CIPH) were evaluated, and the bioglass extract at the concentrations of 5, 50, 100, 500, 1000, 5000 and 10000  $\mu\text{g} / \text{ml}$ . 2). The objective of this study was to evaluate the effect of bioglass application on the surface of the bovine dentin in the parameters of surface microhardness (MD), surface roughness (RS), the obliteration capacity of dentin tubules, studying the dentin permeability (PD) field scanning (FEG) electronics and analysis of ionic composition by X-ray dispersive energy (EDS) spectrometry; these parameters were evaluated in the initial dentine bodies (without treatment), after EDTA, after 24 h of treatment and after brushing. 3). The effect of bioglass application on the dentin surface (in vivo) in an animal gingival recession model was studied, after euthanasia of the animals, the ability to adhesion to the dentin surface was verified by FEG and the presence of the ions of the materials by means of EDS. **Results:** All bioglass maintained cell viability at the lowest concentrations and at concentrations of 5,000 and 10,000  $\text{mg} / \text{mL}$  exhibited cytotoxicity compared to DMEM. In the physical / mechanical tests on dentin, it was observed that the materials had the capacity to maintain or increase MD and RS, and the ability to reduce PD. In the microphotographs (FEG) the adhesion capacity was visualized on the dentin surface and in the (EDS) it was verified the presence of the different ion characteristic of each material. In the animal gingival recession model, it was possible to verify the adhesion capacity of materials in oral conditions closer to clinical reality. **Conclusions:** all biovidros showed biocompatibility in cell culture, ability to obliterate the tubules, remineralize dentin in vivo and invitro.

**Keywords:** Glass, biocompatibility test, dentin sensitivity, dentin permeability, strontium, potassium.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b>	Fotografias de células Fibroblastos linhagem NIH-3T3 e células indiferenciadas de polpa humana-CIPH.....	<b>26</b>
<b>Figura 2.</b>	Diagrama explicativo dos grupos e tipo de células estudados no teste de citotoxicidade <i>in vitro</i> .....	<b>29</b>
<b>Figura 3.</b>	Diagrama descrevendo os testes realizados na avaliação das propriedades mecânicas e físicas dos biovidros aplicados na dentina.....	<b>33</b>
<b>Figura 4.</b>	Sequência realizada para confecção e padronização dos corpos de prova de dentina bovina.....	<b>35</b>
<b>Figura 5.</b>	Sequência realizada para a aplicação do tratamento na superfície dos corpos de prova de dentina bovina e parâmetros analisados.....	<b>37</b>
<b>Figura 6.</b>	Maquina de escovação simulada (ElQuip, Brasil), utilizado no trabalho.....	<b>40</b>
<b>Figura 7.</b>	Fluxograma da sequência e descrição da linha do tempo seguida durante a execução do experimento.....	<b>43</b>
<b>Figura 8.</b>	Fluxograma da sequência e descrição da linha do tempo seguida durante a execução do experimento.....	<b>44</b>
<b>Figura 9.</b>	Sequencia do procedimento cirúrgico para criar a recessão gengival.....	<b>45</b>
<b>Figura 10.</b>	Sequencia da remoção da tela e o fio metálico após 14 dias.....	<b>46</b>
<b>Figura 11.</b>	Valores de absorbância representando a viabilidade celular (%) obtidos pelo ensaio de MTT em células de linhagem NIH-3T3 após 24 h de incubação com os extratos dos biovidro.....	<b>50</b>
<b>Figura 12.</b>	Valores de absorbância representando a viabilidade celular (%) obtidos pelo ensaio de MTT em células de linhagem NIH-3T3 após 48 h de incubação com os extratos dos biovidro.....	<b>51</b>
<b>Figura 13.</b>	Valores de absorbância representando a viabilidade celular (%) obtidos	

	pelo ensaio de MTT em células de linhagem primaria CIPH após 24 h de incubação com os extratos dos biovidro.....	<b>52</b>
<b>Figura 14.</b>	Valores de absorbância representando a viabilidade celular (%) obtidos pelo ensaio de MTT em células de linhagem primaria CIHP após 48 h de incubação com os extratos dos biovidro.....	<b>53</b>
<b>Figura 15.</b>	Valores de absorbância representando a viabilidade celular (%) obtidos pelo teste VN em células de linhagem NIH-3T3 após 24 h de incubação com os extratos dos biovidro.....	<b>54</b>
<b>Figura 16.</b>	Valores de absorbância representando a viabilidade celular (%) obtidos pelo teste VN em células de linhagem NIH-3T3 após 48 h de incubação com os extratos dos biovidro.....	<b>55</b>
<b>Figura 17.</b>	Análise morfológica da linhagem primária CIPH após 24 h de tratamento.....	<b>57</b>
<b>Figura 18.</b>	Análise morfológica da linhagem primária CIPH após 48 h de tratamento.....	<b>58</b>
<b>Figura 19.</b>	Análise morfológica da linhagem NIH/3T3 após 24 h de tratamento.....	<b>59</b>
<b>Figura 20.</b>	Análise morfológica da linhagem NIH/3T3 após 48 h de tratamento.....	<b>60</b>
<b>Figura 21.</b>	Análise da permeabilidade dentinária nos diferentes tempos de avaliação (inicial, após EDTA, após 24h e após escovação) .....	<b>63</b>
<b>Figura 22.</b>	Microfotografias superficiais dos corpos de dentina bovina.....	<b>64</b>
<b>Figura 23.</b>	Análise composicional da superfície dos corpos de prova de dentina bovina.....	<b>65</b>
<b>Figura 24.</b>	Microfotografias superficiais dos molares de rato na região cervical onde foi realizada a cirurgia de recessão gengival com os tratamentos realizados.....	<b>66</b>
<b>Figura 25.</b>	Microfotografias da superfície dos molares de rato winstar na região cervical onde foi realizada a cirurgia de recessão gengival com os tratamentos realizados.....	<b>67</b>

**Figura 26.** Análise composicional da superfície dos molares de rato winstar na região cervical onde foi realizada a cirurgia de recessão gengival com os tratamentos realizados.....**68**

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b>	Composição química dos biovidros experimentais.....	23
<b>Tabela 2.</b>	Descrição dos materiais utilizados para a sínteses dos biovidros experimentas e fabricante .....	24
<b>Tabela 3.</b>	Composição química dos materiais utilizados no experimento 1: biovidros experimentais, biovidro comercial e verniz cavitario.....	25
<b>Tabela 4.</b>	Reagentes utilizados para na preparação da saliva artificial.....	34
<b>Tabela 5.</b>	Composição química dos materiais utilizados no experimento 2: biovidros experimentais e controle comercial .....	39
<b>Tabela 6.</b>	Composição química dos materiais utilizados no experimento 3: biovidros experimentais e materiais comercias.....	42
<b>Tabela 7.</b>	Descrição dos grupos (experimental e controle) e numero (n) de animais por grupo.....	47
<b>Tabela 8.</b>	Médias e desvios-padrão dos dados de microdureza Vickers, obtidos por cada grupo em cada tempo de avaliação.....	61
<b>Tabela 9.</b>	Médias e desvios-padrão dos dados da rugosidade superficial, obtidos por cada grupo em cada tempo de avaliação.....	62

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Céls	Células
COEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CIPH	Células indiferenciadas de polpa humana
CP	Corpo de prova dentina bovina
DMEM	Dubelcco's modified eagle medium
EDS	Espectroscopia de energia dispersiva de raio X
FEG	Microscopia Eletrônica de Varredura por efeito de campo
HD	Hipersensibilidade dentinária cervical
K	Potássio
LaMaV	Laboratório de Materiais Vítreatos
MD	Microdureza
RG	Rugosidade
PD	Permeabilidade dentinária
Sr	Estrôncio
UEPG	Universidade Estadual de Ponta Grossa
UFSCar	Universidade Federal de São Carlos



## LISTA DE SÍMBOLOS E UNIDADES

%	Porcentagem
=	Igual
<	Menor que
>	Maior que
±	Mais ou menos
μm	Micrometro
cm <sup>-1</sup>	Centímetro(s) recíproco(s) ou centímetro(s) inverso(s)
s	segundo(s)
min	Minuto(s)
mm	Milímetro(s)
mm/min	Milímetro(s) por minuto
°C	Grau(s) Celsius
n	Número de corpos-de-prova
N	Newton
Mm	Micrometro
X	Número de vezes
ppm	partes por milhão
h	Hora(s)
α	Nível de significância
p	Valor de probabilidade
mL	Mililitros

## SUMARIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	18
<b>2. PROPOSIÇÃO</b> .....	22
2.1 Proposição geral.....	22
2.2 Proposições específicas.....	22
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	23
3.1 Síntese dos biovidros.....	23
<b>4. EXPERIMENTO 1</b> .....	25
4.1 Delineamento experimental e materiais utilizados.....	25
4.2 Cultural celular.....	26
4.2.1 <i>Descongelamento das células</i> .....	26
4.2.2 <i>Plaqueamento celular</i> .....	28
4.3 Grupos experimentais.....	29
4.4 Testes de citotoxicidade em cultura celular.....	29
4.4.1 <i>Teste de thryazolyl blue tetrazolium bromide (MTT)</i> .....	30
4.4.2 <i>Teste de citotoxicidade por incorporação do vermelho neutro (VN)</i> .....	30
4.4.3 <i>Morfologia celular</i> .....	31
<b>5. EXPERIMENTO 2</b> .....	33
5.1 Delineamento experimental e materiais utilizados.....	33
5.2 Grupos experimentais.....	33
5.3 Obtenção dos corpos de prova de dentina bovina (CP).....	34
5.3.1 <i>Análise da microdureza Vickers (MD)</i> .....	36
5.3.2 <i>Análise da rugosidade superficial (RS)</i> .....	37
5.3.3 <i>Análise de permeabilidade dentinária (PD)</i> .....	38
5.3.4 <i>Microscopia eletrônica de varredura por efeito de campo (FEG)</i> .....	38
5.3.5 <i>Espectrometria de energia dispersiva de raio x (EDS)</i> .....	39
5.3.6 <i>Escovação artificial</i> .....	39
5.4 Análise estatística.....	40
<b>6. EXPERIMENTO 3</b> .....	42
6.1 Delineamento experimental e materiais utilizados.....	42
6.2 Indução da recessão gengival.....	43
6.2.1 <i>Remoção do dispositivo</i> .....	45
6.3 Grupos experimentais.....	46

6.3.1 Protocolo de tratamento.....	47
<b>7. RESULTADOS.....</b>	<b>49</b>
7.1 Experimento 1 (Propriedades biológicas) .....	49
7.1.1 Testes de citotoxicidade.....	49
7.1.2 Análise morfológica.....	56
7.2 Experimento 2 (Propriedades mecânicas e físicas na dentina) .....	61
7.2.1 Microdureza Vickers (MD) .....	61
7.2.2 Rugosidade superficial (RS) .....	61
7.2.3 Permeabilidade dentinária (PD) .....	62
7.2.4 Microscopia eletrônica de varredura por efeito de campo (FEG).....	64
7.2.5 Espectroscopia de energia dispersiva de raios x (EDS) .....	64
7.3 Experimento 3 (Capacidade obliteração dos túbulos dentinários in vivo) .....	66
7.3.1 Microscopia eletrônica de varredura por efeito de campo (FEG) .....	66
7.3.2 Espectroscopia de energia dispersiva de raios x (EDS) .....	68
<b>8. DISCUÇÃO .....</b>	<b>69</b>
<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>77</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>78</b>
<b>ANEXO A – TERMO LIVRE DE DOAÇÃO DOS DENTES PARA A PESQUISA.....</b>	<b>86</b>
<b>ANEXO B - APROVAÇÃO DO PROJETO PELA COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA DA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA (UEPG) .....</b>	<b>88</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A hipersensibilidade dentinária cervical (HD) é definida como uma dor aguda e pontiaguda decorrente da dentina exposta e em resposta a estímulos, tipicamente térmicos, evaporativos, táteis, osmóticos ou químicos, e que não podem ser atribuídos a qualquer outra forma de defeito ou doença dentária. A HD é uma condição de dor dental transitória, que se manifesta imediatamente após aplicar um estímulo na dentina exposta e geralmente termina quando o estímulo é removido (Holland et al. <sup>1</sup> 1997). É um problema comum encontrado em muitas populações adultas, com valores de prevalência amplamente variáveis. A prevalência relatada de hipersensibilidade dentinária varia de 4 a 74%, dependendo da população, do cenário do estudo e do desenho do estudo (Cunha-Cruz et al. <sup>2</sup> 2013). Um estudo realizado com dados coletados de pacientes de consultório particular relatou que 95% dos dentes diagnosticados com HD apresentavam algum nível de recessão gengival e em 91% desses dentes a recessão estava localizada na superfície vestibular do dente afetado (Rees ; Addy <sup>3</sup> 2004; Rees ; Addy <sup>4</sup> 2002). Outro estudo realizado no Brasil relatou que 34% dos pacientes foram diagnosticados com dentes sensíveis, os fatores mais prevalentes associados à HD foram posicionamento dentário anormal (9%), trauma oclusa (7%) e recessão gengival (6%) (Alcantara et al. <sup>5</sup> 2018). Essas diferenças sugerem que a HD pode ser sub-diagnosticada e não reconhecida por clínicos e pacientes.

A qualidade de vida das pessoas com HD pode ser afetada. Eles relataram que a presença de HD dificultou a escovação em 9% dos casos, 28% dos participantes não beberam água fria e 26% não puderam tomar sorvete sem desconforto, de modo que 10% evitaram a área de desconforto (Gillam et al. <sup>6</sup> 1999). Baseado nesses dados, um estudo qualitativo explorou as experiências diárias de pessoas com HD. Os resultados mostraram a profundidade e a complexidade das experiências de dor associadas à sensibilidade, impactos no estado funcional e atividades cotidianas, como comer, beber, falar, escovar os dentes, interação social e também impactos mais sutis nas emoções e na identidade (Gibson et al. <sup>7</sup> 2010). A dor é o principal sintoma da condição (Rees ; Addy <sup>4</sup> 2002; Alcantara et al. <sup>5</sup> 2018; Addy ; Hunter <sup>8</sup> 2003; Liu et al. <sup>9</sup> 1998).

Adicionalmente, tem sido descrito que a dentina afetada por HD apresenta tubúlos dentinários em maior número com aumento de diâmetro, sendo estes mais

permeáveis; sendo essas características diretamente relacionadas com a severidade da HD (Ishikawa et al. <sup>10</sup> 1994; Pashley <sup>11</sup> 1985; Absi et al. <sup>12</sup> 1987). Isso pode levar-nos a pensar que as superfícies expostas da dentina, são um pré-requisito para a manifestação de HD. No entanto, nem sempre as superfícies dentinárias expostas levam à HD.

Existem diferentes teorias que visam esclarecer e compreender como funciona a HD e assim poder propor possíveis tratamentos. A teoria da transdução odontoblástica propõe que a célula odontoblasto ao ser exposto a estímulos externos desencadeia a resposta dolorosa (Maurin et al. <sup>13</sup> 2013; Tokuda et al. <sup>14</sup> 2015). A teoria neural se baseia em que junto com os prolongamentos dos odontoblastos há presença de terminações nervosas dentro dos túbulos dentinários que ao receber estímulos ativam uma resposta neural direta no tecido pulpar (Ahlquist ;Franzen <sup>13</sup> 1999; Hermanstynne et al. <sup>14</sup> 2008). A teoria hidrodinâmica da HD explica o seu mecanismo de ação. Ela afirma que os túbulos dentinários abertos na superfície da dentina exposta uma vez que recebem o estímulo, apresentam uma alteração no fluxo de fluido dentro dos túbulos dentinários, e subsequente o movimento do mesmo, que causará a deformação das terminações nervosas no plexo Raschkow e estimulação dos mecanorreceptores presentes nos terminais nervosos associados aos processos de odontoblastos próximos à polpa, o que leva à transmissão do estímulo doloroso. Esta teoria é amplamente aceita (Liu et al. <sup>9</sup> 1998; Brännström <sup>15</sup> 1963).

Entretanto, nem todos os fenômenos podem ser satisfatoriamente explicados por essa teoria. Por exemplo, o papel da inflamação pulpar, a formação de dentina terciária, o estresse oclusal responsável pelas abfrações cervicais e o envolvimento periodontal ainda estão sendo discutidos nesse contexto (Orchardson ; Gillam <sup>16</sup> 2006).

Devido a sua origem multifatorial, o estudo e o tratamento da HD tem ganhado um amplo interesse tanto na prática clínica como na pesquisa. Diversos tratamentos tem sido propostos, a maioria deles com base na equação de Poiseuille-Hagen, na qual pequenas mudanças no diâmetro dos túbulos dentinários pode modificar a permeabilidade e essa redução pode ser eficaz para tratamento da HD (Prati <sup>17</sup> 1994; Pashley <sup>18</sup> 1994).

Diferentes abordagens para reduzir a HD estão sendo desenvolvidas; e a introdução no mercado de um grande número de produtos para o tratamento da HD

tanto de consumo caseiro (enxaguantes, dentifrícios, etc) como de aplicação no consultório, oferece uma ampla gama de possibilidades para os pacientes. A maioria destes produtos baseia-se no conceito de obliterar/ocluir a abertura dos túbulos na superfície da dentina exposta. Tanto a potencial eficácia como a eficácia clínica foram frequentemente demonstradas por estudos *in vitro* e ensaios clínicos de curta duração, no entanto, nenhum deles conseguiu proporcionar um tratamento definitivo (Tarbet et al. <sup>19</sup> 1982; Frechoso et al. <sup>20</sup> 2003; Topbasi et al. <sup>21</sup> 1998).

Entre as opções de tratamento incluem o uso de cloreto de estrôncio, fluoreto de sódio (Kishore et al. <sup>22</sup> 2002); nitrato de potássio, oxalato de potássio (Gillam et al. <sup>6</sup> 1999; Nagata et al. <sup>23</sup> 1994); adesivos dentinários (Trowbridge ; Silver <sup>24</sup> 1990) e laser (Schwarz et al. <sup>25</sup> 2002). O método de precipitação com fosfato de cálcio (CaP) exibiu uma capacidade potencial para a oclusão dos túbulos dentinários, porque a dentina é composta principalmente de CaP (Ishikawa et al. <sup>10</sup> 1994; Suge et al. <sup>26</sup> 1995)

O desenvolvimento de materiais que sejam bioativos e que possam interagir com o organismo sem gerar respostas negativas dos tecidos, levou ao desenvolvimento dos biovidros, que vem apresentado grande aplicabilidade na área da saúde como opção para a regeneração óssea (Hench e Paschall <sup>27</sup> 1974). Devido a sua bioatividade, este material gera formação de hidrocarbonato apatita, juntamente com a liberação de sílica, permitindo a adesão e proliferação das células sobre a superfície da partícula de vidro (Kokubo et al. <sup>28</sup> 2003). Estudos prévios demonstraram que o biovidro associado com 30% de ácido fosfórico foi capaz de ocluir os túbulos dentinários a uma profundidade de 60  $\mu\text{m}$  (Chang <sup>29</sup> 2003; Lee et al. <sup>30</sup> 2005; Kuo et al. <sup>31</sup> 2007; Wang et al. <sup>32</sup> 2010).

Existem biovidros com partículas na faixa de micrometros e nanômetros, a literatura reporta que a solubilidade das nanopartículas e os efeitos da alta energia superficial e área de superfície elevada, que estão relacionados com o tamanho das mesmas, aumentando a solubilidade e taxa de dissolução (Otto e de Villiers <sup>33</sup> 2009; Chiang et al. <sup>34</sup> 2010). No entanto, a praticidade clínica do biovidro no tratamento da HD ainda é limitada independentemente do tamanho das partículas.

Na literatura tem sido relatado que a associação do biovidro com determinados íons como Zn e Sr tem um papel importante na formação de novo osso (Murphy et al. <sup>35</sup> 2010; Montazerian et al. <sup>36</sup> 2015; Zreiqat et al. <sup>37</sup> 2010). Foi relatado que o Sr diminui a reabsorção e acelera processo de remodelação do osso.

Devido a capacidade de dissolução do biovidro permite com esses íons adicionados sejam liberados ao meio. Substâncias químicas como o flúor ajudam a liberar Ca e P em túbulos (Winston et al. <sup>38</sup> 2010). O biosilicato é um tipo de biovidro que foi desenvolvido como alternativa para o tratamento da HD, seu mecanismo de ação é pela deposição de hidrocarbonato apatita nos túbulos dentinários abertos (Tirapelli et al. <sup>39</sup> 2010). As sais de estrôncio, tanto o cloreto de estrôncio como o acetato de estrôncio e o nitrato de potássio, tem sido estudadas e a literatura relata que são muito eficazes na redução da hipersensibilidade dentinária, contribuindo para a alteração do potencial de membrana da célula nervosa alterando a nocicepção e percepção da dor (Topbasi et al. <sup>21</sup> 1998; Markowitz <sup>40</sup> 2009; Bartold <sup>41</sup> 2006).

Embora algumas estratégias tenham produzido resultados promissores, a eficiência e a longevidade dessas terapias ainda são incertas. Portanto, ainda não foi descoberto um material ideal que possa tratar completamente a HD. O tratamento visa, portanto, não apenas restaurar a impermeabilidade original dos túbulos ao ocluí-los, mas também controlar os elementos neurais dentro da polpa para reduzir os efeitos estimulatórios externos. Esses dois modos de controle são a obliteração parcial ou total dos túbulos dentinários ou a alteração da atividade sensorial pulpar, ou ambos.

O presente estudo tem por objetivo avaliar as propriedades biológicas, físicas, mecânicas e capacidade de obliteração dos túbulos dentinários de novos biovidros contendo estrôncio e potássio como alternativa para o tratamento da HD.

## 2 PROPOSIÇÃO

### 2.1 PROPOSIÇÃO GERAL

Avaliar o efeito de formulações de biovidros experimentais a partir do sistema  $2\text{Na}_2\text{O}.1\text{CaO}.3\text{SiO}_2+6\%\text{P}_2\text{O}_5$  contendo Sr e K, desenvolvidos para o tratamento da hipersensibilidade dentinária cervical considerando aspectos biológicos e propriedades mecânicas/físicas na dentina.

### 2.2 PROPOSIÇÕES ESPECIFICAS

1. Avaliar o efeito dos biovidros experimentais em cultura de células.
2. Estudar o efeito da aplicação dos biovidros experimentais na superfície dentina bovina nos parâmetros de microdureza, rugosidade e condutividade hidráulica.
3. Avaliar o potencial de obliteração dos túbulos dentinários dos biovidros experimentais in vitro em dentina bovina.
4. Estudar o potencial de obliteração dos túbulos dentinários dos biovidros in vivo no modelo animal de recessão gengival em ratos.



### 3 MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi desenvolvido no Programa de Pós-graduação *Stricto sensu* em Odontologia da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG). Os biovidros experimentais avaliados no presente estudo, foram desenvolvidos em parceria com o Programa Pós-graduação em Ciências - Física da UEPG; e sintetizados no Laboratório de Materiais Vítreos (LaMaV) da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar).

#### 3.1 SÍNTESE DOS BIOVIDROS

Para a realização deste estudo foram utilizadas três formulações experimentais de biovidro com a adição de estrôncio e potássio, desenvolvidas a partir do sistema vítreo  $2\text{Na}_2\text{O} \cdot 1\text{CaO} \cdot 3\text{SiO}_2 + 6\text{wt.}\% \text{P}_2\text{O}_5$ , a composição dos biovidros experimentais estão descritos na tabela 1.

Tabela 1. Composição química dos biovidros experimentais.

Material	Composição
1 – Biovidro experimental + estrôncio	$\text{Na}_2\text{O} \cdot 1\text{CaO} \cdot 3\text{SiO}_2 + 6\text{wt.}\% \text{P}_2\text{O}_5 - 5\text{wt.}\% \text{SrO}$
2 – Biovidro experimental + potássio	$\text{Na}_2\text{O} \cdot 1\text{CaO} \cdot 3\text{SiO}_2 + 6\text{wt.}\% \text{P}_2\text{O}_5 - 5\text{wt.}\% \text{K}_2\text{O}$
3 – Biovidro experimental + estrôncio + potássio	$\text{Na}_2\text{O} \cdot 1\text{CaO} \cdot 3\text{SiO}_2 + 6\text{wt.}\% \text{P}_2\text{O}_5 - 5\text{wt.}\% \text{K}_2\text{O} - 5\text{wt.}\% \text{SrO}$

**Fonte:** A autora

Os biovidros foram produzidos pelo método da fusão; primeiramente os pós de carbonato foram secos em estufa a 100 °C por 8 horas. Em seguida foram levados ao forno em cadinhos de platina a temperatura de fusão de 1400 °C por três horas, na sequência foram vertidos e resfriados pela técnica de “*splash cooling*” e em seguida recozidos por duas horas à 455 °C para alívio de tensões residuais. Os biovidros foram resfriados a uma taxa de 2 °C por minuto. Os pós-precursores utilizados para obter os biovidros são descritos na tabela 2.

Tabela 2. Descrição dos materiais utilizados para a sínteses dos biovidros experimentas e fabricante.

<b>Pós-precursores</b>	<b>Marca</b>
Carbonato de cálcio ( $\text{CaCO}_3$ ) – Teor de pureza de 99,0%,	Synth
Carbonato de sódio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) – Teor de pureza de 99,5%,	Synth
Sílica ( $\text{SiO}_2$ )	Zetasil 3
Pentóxido de fósforo ( $\text{P}_2\text{O}_5$ ) – Teor de pureza de 99,9%,	Synth
óxido de estrôncio (SrO) – Teor de pureza de 97,0%,	VETEC
carbonato de potássio ( $\text{K}_2\text{CO}_3$ ) – Teor de pureza de 99,0%,	VETEC

**Fonte:** (Alegria-Acevedo <sup>42</sup> 2016)

O método de fusão produz uma barra de biovidro, que posteriormente foi cortada com disco na máquina de corte (IsoMet 1000, Buehler, Illinois, USA). As lâminas de biovidro foram colocadas num cadinho de ágata junto com esferas de ágata de diferentes tamanhos e em seguida levadas ao moinho de alta energia. Após moagem os biovidros apresentam-se em pó com partículas entre 1 – 25  $\mu\text{m}$ . (Alegria-Acevedo <sup>42</sup> 2016)

Após síntese dos biovidros, procedeu-se a realizar a fase experimental deste estudo, que foi dividida em três experimentos:

- I. **EXPERIMENTO 1:** Avaliação das propriedades biológicas de três formulações experimentais de biovidros em cultura celular e avaliação do efeito antimicrobiano.
- II. **EXPERIMENTO 2:** Efeito da aplicação de formulações de biovidros nas propriedades mecânicas in vitro da dentina bovina: análise da rugosidade superficial, microdureza, condutividade hidráulica e MEV.
- III. **EXPERIMENTO 3:** Avaliação in vivo do efeito de três biovidros experimentais contendo estrôncio e potássio no tratamento da hipersensibilidade dentinaria no modelo de recessão gengival em molares de rato.

## 4 EXPERIMENTO 1

### 4.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E MATERIAIS UTILIZADOS

Foram estudadas as propriedades biológicas dos diferentes biovidros (experimentais e controle); em cultura celular foi avaliada a citotoxicidade dos materiais e em cultura bacteriana se avaliou seu potencial efeito antimicrobiano. Os materiais utilizados são descritos na tabela 3.

Tabela 3. Composição química dos materiais utilizados no experimento 1: biovidros experimentais e biovidro comercial\*.

<b>Material</b>	<b>Composição</b>
1 – Biovidro experimental + estrôncio	$\text{Na}_2\text{O}.1\text{CaO}.3\text{SiO}_2+6\text{wt.}\% \text{P}_2\text{O}_5 -5\text{wt.}\% \text{SrO}$
2 – Biovidro experimental + potássio	$\text{Na}_2\text{O}.1\text{CaO}.3\text{SiO}_2+6\text{wt.}\% \text{P}_2\text{O}_5 -5\text{wt.}\% \text{K}_2\text{O}$
3 – Biovidro experimental + estrôncio + potássio	$\text{Na}_2\text{O}.1\text{CaO}.3\text{SiO}_2+6\text{wt.}\% \text{P}_2\text{O}_5 -5\text{wt.}\% \text{K}_2\text{O}-5\text{wt.}\% \text{SrO}$
4 – Biosilicato®	23.75 wt.% $\text{Na}_2\text{O}$ –23.75 wt.% $\text{CaO}$ –48.5 wt.% $\text{SiO}_2$ –4 wt.% $\text{P}_2\text{O}_5$

\*Composição do material comercial de acordo com o fabricante.

**Fonte:** A autora.

Os testes citotoxicidade celular são amplamente usados como o primeiro passo na avaliação de biocompatibilidade de novos materiais. Com o objetivo de prever e conhecer se eles são ou não aptos para uso ou consumo pelos seres humanos. O Órgão Internacional de Padronização (International Standard Organization) ou ISO (pelas siglas em inglês), na normativa 10993-5-2009 descreve os testes e procedimentos que podem ser realizados no momento de determinar a citotoxicidade de novos dispositivos e materiais, e os agrupam nas seguintes categorias de avaliação (ISO <sup>43</sup> 2009):

- a. – Avaliações de danos celulares por meios morfológicos;
- b. – Medições de dano celular;
- c. – Medições do crescimento celular;
- d. – Medições de aspectos específicos do metabolismo celular.

No presente estudo foram utilizados dois tipos de células, (A) células NIH-3T3 ATCC® CRL-1658™, linhagem imortalizada de fibroblastos provenientes de

camundongo (identificador único D041721); (B) células indiferenciadas de polpa humana (CIPH) (figura 1). As células foram gentilmente fornecidas pelo Laboratório de Histopatologia e Cultura Celular do Programa de Odontologia da UEPG. Foram realizados dois testes que avaliam o metabolismo e crescimento da célula e um teste de avaliação morfológica.

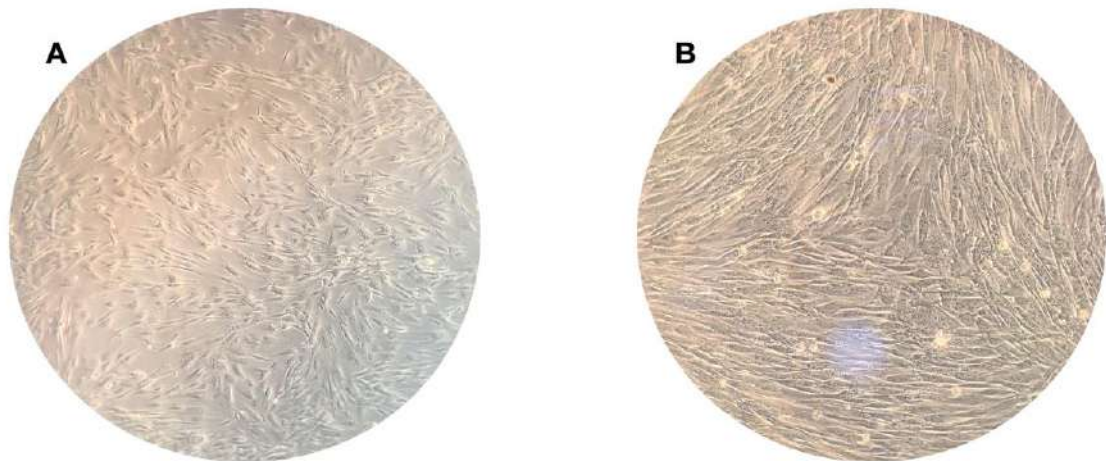


Figura 1. Fotografias de células Fibroblastos linhagem NIH-3T3 (A) e células indiferenciadas de polpa humana-CIPH (B), tomadas no microscópio óptico invertido com objetiva 40x (Carl Zeiss, modelo Axiovert 40 CFL, Carl Zeiss do Brasil, São Paulo, SP).

**Fonte:** A autora

## 4.2 CULTURA CELULAR

### 4.2.1 Descongelamento das células

As células de linhagem NIH/3T3 se encontravam congeladas em tubos criogênicos armazenadas em freezer a (-80 °C) e foram descongeladas colocando-as no banho-maria com uma temperatura de 37 °C, após descongelamento o conteúdo do tubo criogênico foi retirado e colocado em um tubo Falcon de 15 mL contendo 4 mL de meio tipo Dubelcco's modified eagle medium (DMEM) suplementado com 20% de soro fetal bovino (SFB) para neutralizar o efeito do DMSO (dimeltisulfoxido) e levado a centrifuga a 1200 rpm durante 8 min. O sobrenadante foi descartado e o pellet de células re-suspendido em 1 mL de meio DMEM suplementado com 10% de SFB e 0,01% de Penicilina estreptomicina 1000UI (Gibco®, Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, MA, EUA), e é isto o que

denominamos meio completo. Em seguida foram colocadas dentro da garrafa de crescimento celular. As garrafas foram colocadas em estufa umidificada com 5% de CO<sub>2</sub> a 37 °C (MCO – 19AIC, Sanyo®, Osaka, Japão). O meio de cultura foi trocado a cada 48 horas e se realizou monitoramento diário do crescimento celular em microscópio óptico invertido (Carl Zeiss, modelo Axiovert 40 CFL, Carl Zeiss do Brasil, São Paulo, SP); até observar a confluência da monocamada celular e assim realizar os subcultivos.

Para obtenção das células linhagem primária indiferenciadas de polpa humana (CIPH); foi realizado processo de coleta dos dentes e para obtenção do cultivo celular foram seguidos protocolos descritos anteriormente na literatura (Huang et al. <sup>44</sup> 2006; Huller <sup>45</sup> 2018)

Foram utilizados dois dentes humanos, terceiros molares superiores, com raiz completamente formada, extraídos sem odontosseção. Todos os dentes estavam sem lesões cariosas ou restaurações. Os dentes foram extraídos durante as clínicas da disciplina de cirurgia da UEPG, por indicação terapêutica (não vinculada com esta pesquisa). Os pacientes foram esclarecidos sobre os objetivos do presente estudo e assinaram um Termo de Doação de Dentes para a Pesquisa (ANEXO A).

Imediatamente após a exodontia, cada dente foi lavado com solução de gluconato de clorexidina a 0,12% e acondicionado individualmente em um tubo tipo Falcon de 50 mL (Kasvi®, Curitiba, Brasil), contendo 10 mL de meio de transporte, composto por 3% de Penicilina 10000 UI/mL /Estreptomicina 10000 µg/mL (Gibco®, Maryland, EUA) e 97% de PBS (Ensure®, Darmstadt, Alemanha). Em seguida, os dentes foram transportados para o laboratório de cultivo celular da UEPG.

Cada dente foi retirado do tubo tipo Falcon e sua superfície externa raspada com curetas periodontais estéreis. Em seguida, os dentes foram submetidos a imersão parcial (porções coronárias e  $\frac{2}{3}$  radiculares) em solução de gluconato clorexidina 0,12% por um minuto de modo a evitar o contato da solução antisséptica com a porção apical da raiz. Os dentes foram enrolados em gaze e fraturados utilizando um dispositivo previamente esterilizado. Todos os procedimentos seguintes e ensaios foram realizados em fluxo laminar, sob condições de assepsia. O material pulpar foi então removido com o auxílio de uma pinça e utilizando uma seringa descartável. A polpa foi lavada com PBS sobre uma placa de Petri para remover fragmentos de dentina.

O tecido pulpar foi cortado em pequenos fragmentos (1-2 mm) utilizando uma tesoura, para desagregação mecânica das células. Os fragmentos foram colocados em garrafas de cultura de 25 cm<sup>2</sup> (Kasvi®, Curitiba, Brasil) com meio de cultura DMEM suplementado com 20% de soro fetal bovino. Foram realizados movimentos leves para espalhar os fragmentos nas garrafas e estas mantidas a 37°C em incubadora com 5% de CO<sub>2</sub> umidificada.

Aproximadamente em 15 dias foram observadas as primeiras células ao redor dos tecidos pulpares, com aproximadamente 30 dias foi observado que as células atingiam 70% de confluência e em média com 45 dias atingiam 100% de confluência. Uma vez observado o crescimento celular ao redor dos fragmentos, estes foram removidos cuidadosamente.

#### *4.2.2 Plaqueamento Celular*

O plaqueamento foi realizado com as células obtidas no terceiro subcultivo. As células foram desaderidas do fundo da garrafa retirando o meio e colocando 3 mL de tripsina com ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) a 0,05 % (Gibco® by Life Technologies, Canadá). Após 5 min em estufa umidificada 5% CO<sub>2</sub> a 37 °C, se adicionou 3 mL de meio completo para neutralizar o efeito da tripsina. Em seguida o conteúdo da garrafa foi coletado e colocado em um tubo falcon de 15 mL, e levado a centrifugação numa velocidade de 1200 rpm durante 8 min com o objetivo de precipitar as células e formar um pellet.

Para realizar a contagem de células o pellet foi suspenso em 1 mL de meio DMEM, e se tomou uma alíquota (10 µL) desse meio com células e foi adicionado 10 µL de azul de tripan (Vetec Química Fina Ltda, Rio de Janeiro, Brasil). Se homogeneizou e 10 µL que foram colocados na câmara hemo-citométrica tipo Neubauer (Boeco, Hamburg, Alemanha), onde as células viáveis foram contadas com a utilização do microscópio óptico invertido em um aumento de 25x. As células foram plaqueadas na densidade de 1x10<sup>4</sup> céls/poço, em placas de 96 poços. Foram mantidas em estufa umidificada a 37 °C com 5% de CO<sub>2</sub> durante 24 h antes de realizar o experimento. Para a análise morfológica foi realizado o plaqueamento na densidade de 1x10<sup>3</sup> céls/poço.

### 4.3 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Para realizar o teste de citotoxicidade, optou-se pelo uso do extrato dos biovidros, devido a sua apresentação em pó. Para o preparo do extrato dos biovidros, todos os pós foram previamente colocados sobre papel filtro e pesados em uma balança analítica (AY220, Shimadzu, Kioto, Japão). Foram colocados dentro de placas de petri de vidro, e esterilizados em estufa seca com uma temperatura de 160 °C durante 2 h; devido a que a temperatura de fusão dos materiais estar acima de 1000 °C, não houve riscos de alterar suas propriedades durante o processo de esterilização. Em seguida, materiais foram retirados da estufa e colocados dentro do fluxo laminar junto com meio DMEM suplementado com 1% de SBF. Foi preparada uma solução mãe na concentração de 10000 µg/mL do biovidro com o meio, e armazenados por 24 h em estufa a 36,5 °C. Após esse período de tempo se realizaram as seguintes diluições seriadas: 5, 50, 100, 500, 1000, 5000 e 10000 µg/mL.

Para realizar o tratamento, o meio que estava em contato com as células foi substituído pelas diluições seriadas do extrato dos biovidros. O tratamento foi realizado em triplicata por cada concentração estudada e repetido 3 vezes; os tempos de avaliação foram de 24 e 48 h após tratamento. O delineamento e grupos experimentais são descritos na figura 2.

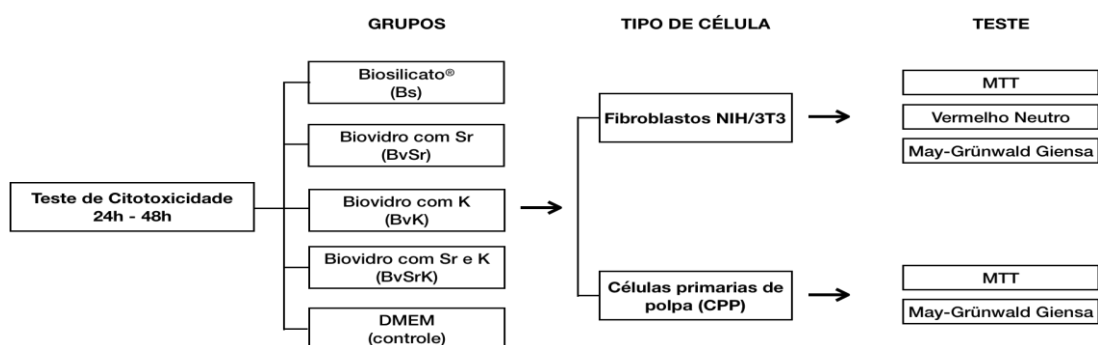


Figura 2. Diagrama explicativo dos grupos e tipo de células estudados no teste de citotoxicidade *in vitro*.

**Fonte:** A autora.

### 4.4 TESTES DE CITOTOXICIDADE EM CULTURA CELULAR

A avaliação dos efeitos citotóxicos e morfológicos dos biovidros nas células após ser expostas ao extrato dos diferentes materiais, foi realizado dois testes de

viabilidade e proliferação celular para as células de linhagem NIH/3T3; nas células CIHP foi realizado um teste de viabilidade e proliferação celular, e em ambos tipos de células foi realizado o teste de análise morfológica. Como controle positivo de morte celular foi usado DMSO e como controle negativo de morte celular foi utilizado o meio para a manutenção das células DMEM.

#### *4.4.1 Teste Trhiazolyl blue tetrazolium Bromide (MTT)*

A viabilidade celular foi analisada quantitativamente por meio da análise colorimétrica MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, MA, EUA), o qual avalia a atividade da enzima redutase mitocondrial nas células. Baseado na clivagem do sal amarelo tetrazólio (membrana permeável) para cristais de formazan azuis/púrpura por células metabolicamente ativas. Nesta técnica, após 24h e 48 h do tratamento, se prepara a solução de MTT na concentração de 0,5 mg/mL de meio DMEM com 1 % de SFB. O meio de cultura é removido das placas, sendo adicionado o meio com MTT, em seguida a placa é colocada em estufa umidificada 5% CO<sub>2</sub> a 37 °C durante 3 a 4 h.

A solução de MTT foi retirada, sendo acrescentado 200 µL de álcool absoluto por poço e a leitura da placa foi feita em espectrofotômetro (Biotek EL 800, Biotek, Winooski, VT, EUA) a 570 nm. A análise da atividade mitocondrial é mesurada pela comparação dos valores de absorbância dos poços tratados com os obtidos no controle negativo (DMEM), se os valores são menores considera-se que há uma redução na proliferação celular. Se os valores de absorbância forem maiores, considera-se que há um aumento na proliferação celular.

#### *4.4.2 Teste de citotoxicidade por incorporação do vermelho neutro (VN)*

O ensaio de citotoxicidade pelo método colorimétrico de incorporação do VN (3-Amino-7-dimethylamino-2-methylphenazine hydrochloride) (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, MA, EUA). É um método comum utilizado para detectar a viabilidade celular. O princípio deste ensaio baseia-se na detecção de células viáveis através da absorção do cromóforo eurodina. O VN é absorvido nos lisossomos de células viáveis. O ensaio foi realizado após 24 e 48 h da aplicação dos tratamentos nas células. A solução de VN foi preparada adicionado 100 µL da



solução concentrada de VN em 9900  $\mu\text{L}/\text{DMEM}$ , em seguida esta solução foi levada à estufa umidificada 5%  $\text{CO}_2$  a 37 °C durante 30 min. Após esse tempo a solução foi centrifugada a 3200 rpm por 10 min. O meio de cultura é então substituído pelo meio com o VN. A incorporação do corante pelas células vivas foi verificada após 3 h de incubação em estufa. Após esse tempo, o meio foi removido e as células foram lavadas com PBS (solução tampão fosfato-salina); em seguida, o PBS é retirado e se realiza uma segunda lavagem com solução de 1% de  $\text{CaCl}_2$  em formaldeído 0,5% e agitada levemente; em seguida é descartada a solução e uma solução de ácido acético em etanol foi colocada em cada poço, deixado a placa em agitação suave durante 10 min. Após a lavagem, as células viáveis liberam o corante incorporado. Para realizar avaliação quantitativa do número de células viáveis se realiza a leitura da placa em espectrofotômetro (Biotek EL 800, Biotek, Winooski, VT, EUA) a 540 nm. Com os valores de absorbância foram realizados conforme descritos para o teste do MTT.

#### *4.4.3 Morfologia celular*

A análise morfológica foi realizada com o objetivo de estudar o efeito dos biovidros na célula, para este teste foi realizada a coloração de May-Grünwald-Giemsa, utilizada para a observação morfológica das células sanguíneas. Esta coloração baseia-se nos diferentes pH das estruturas celulares, de modo que, as organelas impregnam-se de corantes ácidos (eosina), mostrando-se, assim acidófilas (citoplasma). Por outro lado, os ácidos nucléicos e proteínas, do núcleo, coram pelos corantes básicos (azul B), mostrando-se coradas de um roxo intenso ou violeta. A cromatina nuclear apresenta-se corada de violeta escuro, apresentando bem visíveis as estruturas da cromatina, podendo-se observar a sua disposição e densidade, a qual varia com a intensidade de cor.

Para este teste as células cultivadas foram colocadas sobre lamínulas circulares (GLASSCYTO; diâmetro 13 mm e espessura 0,13 – 0,16 mm, Brasil), as quais foram colocadas dentro de placas de 24 poços, e tratadas com os extratos dos biovidros.

A análise morfológica foi realizada 24 e 48 h após tratamento. O processo de coloração inicia-se com a remoção cuidadosa do meio, em seguida se coloca PBS a 1% até cobrir a lamínula e se agita levemente e retira o PBS; a fixação das células é

feita com a adição de 300µL de formol 2% diluído em PBS; este fixador permite a realização de uma fixação rápida alterando pouco a estrutura celular; passados 10 min o formol é retirado. Após realizada a fixação, efetua-se a coloração propriamente dita. O corante May-Grünwald é colocado em quantidade suficiente para cobrir a lamínula, sendo mantido por 5 min; em seguida se retira o corante lavando-o com água destilada por 1 min para remover a totalidade do corante; em seguida coloca-se o corante Gienza, diluído previamente na proporção de 1:5 por 15 min, em seguida as lamínulas são lavadas com água para a montagem em lâminas de vidro. As fotografias foram realizadas no microscópio binocular biológico (BX-41 Olympus® American Inc., EUA) com câmera digital adaptada (DP71 Olympus® American Inc., EUA) na objetiva ocular 10x.

## 5 EXPERIMENTO 2

### 5.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E MATERIAIS UTILIZADOS

Foram estudadas as propriedades mecânicas e físicas dos diferentes biovidros (experimentais e controle) quando aplicados no substrato dental. Foi estudado o efeito da aplicação dos diferentes tratamentos na rugosidade superficial (RS); microdureza Vickers (MdV); permeabilidade dentinária (PD); foi realizada análise morfológica na microscopia eletrônica de varredura por efeito de campo (FEG) e análise da composição iônica por meio de espectroscopia de raios X por dispersão em energia (EDS) que está acoplado ao FEG (figura 3).

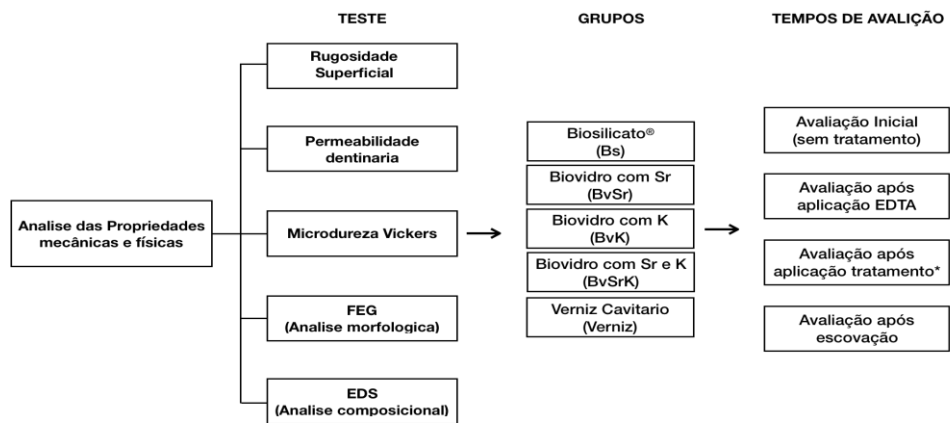


Figura 3. Diagrama descrevendo os testes realizados na avaliação das propriedades mecânicas e físicas dos biovidros aplicados na dentina.

**Fonte:** A autora.

### 5.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Foram utilizados os diferentes biovidros (experimental e controle) o qual tem apresentação de pó, sendo utilizado verniz cavitaro (cavitine, SS White, São Cristovão - RJ) como veículo para realizar a aplicação dos tratamentos na superfície dentinária. Optou-se pelo uso de dentina bovina pela semelhança com a dentina humana e pela facilidade de obtenção da amostra (Tanaka et al. <sup>46</sup> 2008; Reis et al. <sup>47</sup> 2004; Camargo et al. <sup>48</sup> 2007)(ref). Os materiais utilizados são descritos na tabela 4.

Tabela 4. Composição química dos materiais utilizados no experimento 2: biovidros experimentais e materiais comerciais\*.

<b>Material</b>	<b>Composição</b>
1 – Biovidro experimental + estrôncio	$\text{Na}_2\text{O} \cdot 1\text{CaO} \cdot 3\text{SiO}_2 + 6\text{wt.}\% \text{P}_2\text{O}_5 - 5\text{wt.}\% \text{SrO}$
2 – Biovidro experimental + potássio	$\text{Na}_2\text{O} \cdot 1\text{CaO} \cdot 3\text{SiO}_2 + 6\text{wt.}\% \text{P}_2\text{O}_5 - 5\text{wt.}\% \text{K}_2\text{O}$
3 – Biovidro experimental + estrôncio + potássio	$\text{Na}_2\text{O} \cdot 1\text{CaO} \cdot 3\text{SiO}_2 + 6\text{wt.}\% \text{P}_2\text{O}_5 - 5\text{wt.}\% \text{K}_2\text{O} - 5\text{wt.}\% \text{SrO}$
4 – Biosilicato®	23.75 wt.% $\text{Na}_2\text{O}$ –23.75 wt.% $\text{CaO}$ –48.5 wt.% $\text{SiO}_2$ –4 wt.% $\text{P}_2\text{O}_5$
5 – Verniz cavitario	Nitrocelulose, acetato de etila e álcool anidro

\*Composição do material comercial de acordo com o fabricante.

**Fonte:** A autora.

### 5.3 OBTENÇÃO DOS CORPOS DE PROVA DE DENTINA BOVINA (CP)

As amostras foram preparadas a partir de 92 dentes bovinos. Os dentes foram demarcados na junção cimento-esmalte (JCE) com o uso de uma caneta e em seguida, com uma ponta diamantada esférica 1015 (KG Sorensen, Cotia, São Paulo, Brasil) em alta rotação, sob refrigeração ar-água, foi feito um sulco na JCE. Foi considerada as angulações da superfície vestibular e tendo como parâmetro de profundidade, metade da espessura da ponta diamantada. Após realização deste primeiro sulco de orientação, mediu-se 4 mm em direção apical a partir do primeiro sulco e realizou-se um segundo sulco de orientação com os mesmos parâmetros do primeiro. Em seguida os sulcos foram unidos, usando-se uma ponta diamantada tronco cônica 4370 (KG Sorensen, Cotia, São Paulo, Brasil) promovendo o desgaste do cimento e de pequena quantidade de dentina radicular, gerando um preparo cavitário tipo classe V o que simula uma lesão cervical não cariosa.

Após o desgaste na região cervical, os dentes foram seccionados no limite amelo-cementário, separando-se coroa e raiz, usando um disco diamantado flexível 7020, dupla face (KG Sorensen, Cotia, São Paulo, Brasil). Em seguida se removeu o tecido pulpar remanescente com lima nº 40 (Lima K Flexofile 25 mm Maillefer, Dentsply Sirona, Alemanha). As raízes foram seccionadas transversalmente a 2 mm abaixo do sulco apical realizado anteriormente, o remanescente dentário foi seccionado no centro do canal radicular, deste modo, se obteve corpos de prova (CP) de formato quadrangular com espessuras variadas. Após este procedimento,

os CP foram planejados na superfície vestibular, usando-se lixas de carvão de silício nas granulações de 1000, 1200, 1500, 2000, 2500 e 4000. Este procedimento foi realizado na lixadeira Politriz Manual Arnopol-E (Arotec S/A Indústria e Comércio, Cotia, São Paulo, Brasil) e sob refrigeração com água corrente. Cada CP foi polido por 1 minuto em cada lixa utilizada, mantendo-se o mesmo sentido de desgaste (figura 4).

Os procedimentos foram realizados com o objetivo de padronizar a superfície dentinária que foram posteriormente submetidas à verificação do potencial de oclusão dos túbulos dentinários pelos materiais a serem testados. Após a conclusão desta etapa, as superfícies internas dos CP foram lixadas com o objetivo de padronizá-las em espessura de  $1,0 \pm 0,3$  mm, sendo confirmada com o uso de paquímetro digital (Absolute Mitutoyo 500-171-20B, Kawasaki, Japão). Em seguida foram colocadas em uma cuba ultrassônica (Cristófoli, Campo Mourão, PR-Brasil) por 5 minutos sem aquecimento com o intuito de remover a lama dentinária formada em consequência da planificação. Os CP foram armazenados em placa de 96 poços contendo água destilada e sob refrigeração  $-20$  °C até o momento do uso.

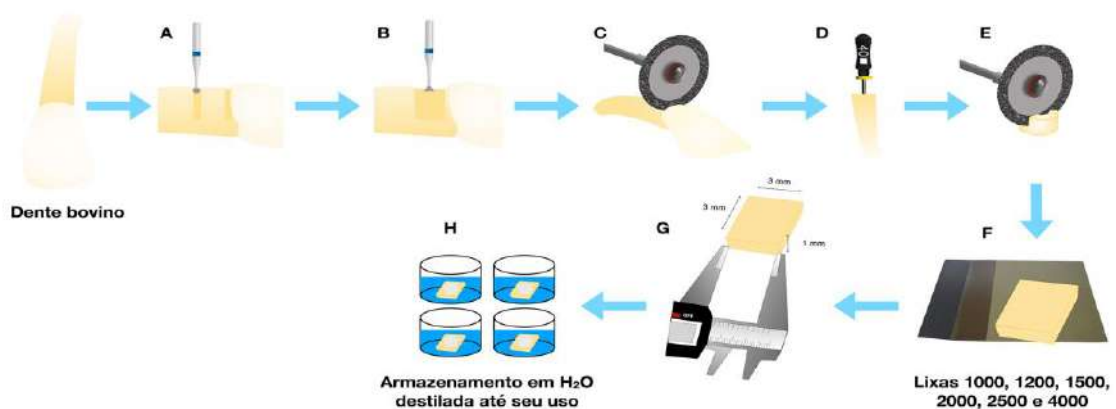


Figura 4. Sequência realizada para confecção e padronização dos corpos de prova de dentina bovina usados para os testes do experimento 2. (A) realização de dois sulcos um no nível da JCE e o segundo 4 mm abaixo do primeiro; (B) Desgaste da superfície presente entre os dois canais previamente realizados; (C) Corte separando a coroa da raiz; (D) remoção do tecido pulpar radicular; (E) corte separando a fase vestibular da palatina; (F) polimento; (G) medição com paquímetro e (H) armazenamento em água destilada.

**Fonte:** A autora.

A sequência de tratamento dos CP foi igual para todos os grupos e para todos os testes realizados neste experimento. Foi realizada a avaliação inicial de cada CP para cada parâmetro a ser avaliado (microdureza Vicker's, rugosidade superficial e permeabilidade dentinária), foram realizadas 6 leituras para cada parâmetro e para cada momento de avaliação. Na sequência, em cada CP realizada aplicação ativa com microbrush de EDTA a 24% por 5 minutos, com o objetivo de abrir os túbulos dentinários e simular uma dentina afetada por HD. Em seguida os CP foram colocados em uma cuba ultrassônica por 8 minutos com aquecimento para remover completamente o EDTA. Após realizado esse passo, os parâmetros foram novamente avaliados e registrado como o valor "após EDTA". Na sequência o excesso de água de cada CP foi removido com aplicação de jato de ar livre de água por 15 s a uma distância de 10 cm. Na continuação cada CP recebeu o tratamento selecionado com um dos diferentes materiais: Biosilicato<sup>®</sup>, Biovidro-Sr, Biovidro-K, Biovidro-Sr/K e Verniz. O verniz cavitário foi usado como veículo mais 5% do biovidro em peso; foram realizadas 3 aplicações seguidas com microbrush (Alegria-Acevedo <sup>42</sup> 2016). Após aplicação do respectivo tratamento todos os CP foram armazenados em saliva artificial, a composição está descrita na tabela 5. E colocados em estufa úmida 37 °C durante 24 h. Passado esse tempo de armazenamento, todos os parâmetros foram registrados ("após 24 h"). Em seguida os CP foram submetidos a escovação artificial e após esse procedimento foram avaliados novamente todos os parâmetros e foi registrado como a medida "após escovação", (figura 5). Os CP foram seus próprios controles, já que foram analisados nos diferentes tempos de avaliação.

### 5.3.1 Análise da Microdureza Vickers (MD)

A microdureza superficial foi avaliada usando o microdurômetro (Micro Hardness tester, Shimadzu, Kyoto, Japão). Foi utilizado o indentador *Vicker's*, com carga de 50 gr ou 0,5 N durante 15 s. Foram realizadas leituras em quatro momentos diferentes: (A) microdureza inicial (dentina após polimento); (B) microdureza após aplicação EDTA 24% na superfície da dentina; (C) microdureza após tratamento (24 h após aplicação do tratamento na dentina); (D) microdureza final (após escovação artificial da dentina). Em cada corpo de prova fora realizadas 5 leituras no centro, O valor obtido foi expresso em microdureza *Vickers*, no qual o

valor da microdureza superficial de cada corpo de prova foi determinado pela média aritmética dos cinco valores obtidos no corpo de prova em cada um dos momentos de avaliação. Os CP foram seus próprios controles em cada um dos momentos de avaliação.

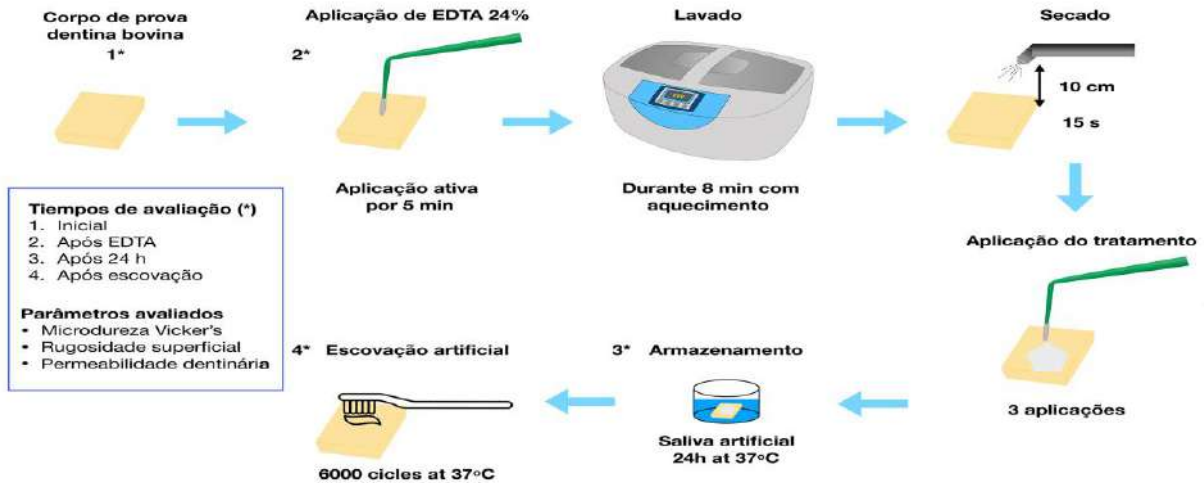


Figura 5. Sequência realizada para a aplicação do tratamento na superfície dos corpos de prova de dentina bovina e parâmetros analisados: microdureza Vicker's; rugosidade superficial e permeabilidade dentinária e tempos de avaliação: (1) avaliação inicial; (2) avaliação após aplicação EDTA; (3) avaliação após 24 h de tratamento; (4) avaliação após escovação.

**Fonte** A autora.

### 5.3.2 Análise da Rugosidade Superficial (RS)

A rugosidade superficial dos CP foi avaliada utilizando-se um rugosímetro de contato modelo SurfTest-301, número de série 15700438 (Mitutoyo, Japão). Para realizar a medida, o equipamento possui uma ponta de diamante de alta precisão que se desloca paralelamente à superfície do CP, gerando uma curva com variação de alturas, reproduzindo com isso, exatamente os vales e picos existentes na superfície do CP. Após obter esses dados, o rugosímetro calculou o perfil médio entre os vales e picos e gerou o valor de Ra, que é a medida mais usada para a indicação da rugosidade. O rugosímetro foi calibrado pelo resultado da placa padrão em 9,50 µm para rugosidade total (Rt) e 2,95 µm para Ra, e regulado com *cut-off* de 0,25 mm, para minimizar a interferência de ondulação da superfície, e limite de medição de 1,25 mm. Foram realizadas oito leituras distribuídas sob o CP, tendo como referência sempre a mesma direção das amostras, para obter o valor de Ra; e a rugosidade foi avaliada em quatro momentos diferentes: RS inicial dos CP foi

verificada antes da aplicação dos tratamentos experimentais; RS após aplicação de EDTA 24% na superfície; RS após 24 h de aplicação do tratamento com os biovidros e RS após realizar escovação simulada. A RS de cada CP foi obtida calculando-se a média aritmética dos oito valores de Ra. Todas as leituras foram realizadas nos mesmos corpos, sendo assim seus próprios controles.

### *5.3.3 Análise de Permeabilidade Dentinária (PD)*

A permeabilidade das amostras de dentina foi mensurada pela filtração de água destilada através da dentina e expressa em termos de condutividade hidráulica usando o método sugerido por Pashley e Galloway em 1985 (Pashley<sup>11</sup> 1985). Este teste foi realizado usando o equipamento para medição da permeabilidade dentinária TTHD-03 (Odeme Biotechnology, Joaçaba, Santa Catarina, Brasil). A PD é quantificada mensurando o deslocamento de uma bolha de ar por um tubo capilar de vidro com comprimento (75 mm) e calibre (1,1 mm).

Realizou-se a mensuração da PD em quatro momentos: (A) permeabilidade inicial (dentina após polimento); (B) permeabilidade máxima (após aplicação EDTA 24% na superfície da dentina); (C) permeabilidade após tratamento (24 h após aplicação do tratamento na dentina); (D) permeabilidade final (após escovação artificial da dentina).

As amostras foram seus próprios controles, sendo que a filtração da água destilada foi medida antes e após a utilização dos diferentes materiais a serem avaliados. Neste tubo há sempre 75 µL de água destilada. Para este teste foi adotado um parâmetro de 1 minuto para avaliar o deslocamento da bolha de ar e foi utilizada uma pressão constante de trabalho de 10 PSI.

### *5.3.4 Microscopia eletrônica de varredura por efeito de campo (FEG)*

A avaliação morfológica superficial e longitudinal dos CP de dentina foi realizada em microscópio eletrônico de varredura por efeito de campo modelo MIRA3 LM (TESCAN Inc., Warrandale, PA, EUA). A análise morfológica foi realizada em 4 momentos diferentes: CP após polimento; CP após aplicação de EDTA 24%; CP após 24 h de aplicação do tratamento e CP após escovação artificial. Para cada análise foram usados três CP por grupo experimental. Os CP foram levados à estufa



seca 37 °C por 12 h, para reduzir a umidade do CP e permitir realizar melhor o vácuo para a metalização. Os CP foram fixados em suporte metálico por médio de uma fita condutora de carbono (Fita de carbono com revestimento duplo 8mm Wx120m L, PELCO Tabs™, UK); e em seguida foram submetidos à metalização com liga ouro/paládio no equipamento (SC7620 Mini sputter coater, Qorum Technologies, East Sussex, UK) IC). As fotomicrografias foram obtidas após a visualização das amostras no aumento de 1500 vezes, empregando voltagens de aceleração de 10 ou 15 kV. O registro das imagens foi realizado por meio da utilização do software MIRA<sup>TC</sup>.

### 5.3.5 Espectrometria de energia dispersiva de raio X (EDS)

Os elementos químicos presentes na superfície dos CP foram analisados por meio de espectroscopia de energia dispersiva de raios X (Oxford Instruments, Tubney Woods, Abingdon, UK) acoplado no FEG modelo MIRA3 LM (TESCAN Inc., Warrandale, PA, EUA). As análises foram realizadas nas mesmas amostras usadas para realizar as microfotografias, devido à vantagem de poder realizar os dois testes no mesmo equipamento.

Tabela 5. Reagentes utilizados para na preparação da saliva artificial.

Reagente	Fabricante/Lote	(g.l <sup>-1</sup> )
NaF, P.A.	Synth, Diadema, SP, Brasil/42953	0,0044
MgCl <sub>2</sub> , P.A.	Synth, Diadema, SP, Brasil/112987	0,06
CaCl <sub>2</sub> , P.A.	Synth, Diadema, SP, Brasil/10257	0,17
KCl, P.A.	Synth, Diadema, SP, Brasil/23564	0,62
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O, P.A.	Synth, Diadema, SP, Brasil/105427	4,82
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /H <sub>2</sub> O, P.A.	Synth, Diadema, SP, Brasil/93438	4,04
H <sub>2</sub> O destilada		

Fonte (Reinke et al. <sup>49</sup> 2011).

### 5.3.6 Escovação artificial

Para realizar a escovação simulada foi utilizado o equipamento de escovação simulada (ElQuip, São Carlos, São Paulo, Brasil) (Figura 6). As amostras foram colocadas em um tubo de PVC preenchido com resina acrílica para fixação das mesmas durante a escovação. Na sequência foram submetidas a 3000 ciclos de escovação com carga de 400 gramas de força (gf) numa velocidade de 4,5

ciclos/segundo, em seguida, as amostras foram giradas 90° e escovadas por mais 3000 ciclos, totalizando 6000 ciclos de escovação, que tem uma equivalência de aproximadamente 3 meses de escovação feita por um indivíduo (Errante<sup>50</sup> 2016).

Foram utilizadas escovas dentais novas, de cerdas macias (Eco Essencial, Johnson & Johnson, São José dos Campos, SP, Brasil); acopladas nos braços metálicos do aparelho que realiza movimentos de vai e vêm, somente as cabeças das escovas dentais e 10 mm dos cabos foram inseridas nos braços da máquina o restante do cabo foi cortado permitindo padronizar o peso das escovas em 2 g.

O dentifrício foi diluído em água destilada com auxílio de um agitador magnético sem aquecimento (Fisatom, São Paulo, SP-Brasil) de acordo com a especificação da ISO 14569-1 (International Organization for Standardization 1999) na proporção de 1:2 em peso, com o objetivo de reproduzir a diluição que ocorre pela saliva. Depois de diluído, o dentifrício foi colocado em seringas descartáveis de 20 mL (Embramac, Itajaí, SC-Brasil) que foram acopladas a máquina de escovação, sendo esta regulada para injetar 2 mL do dentifrício diluído a cada 2 minutos. A temperatura dentro da máquina de escovação foi padronizada em  $37 \pm 0,3$  °C.

Após terminar o ciclo de escovação foram realizadas as avaliações finas de MD, RS, permeabilidade dentinária e FEG/EDS.



Figura 6. Aparelho de escovação simulada (EIQuip), utilizado no trabalho.

**Fonte** A autora.

#### 5.4 ANALISE ESTATÍSTICA

Os dados da microdureza Vickers e rugosidade superficial e foram analisados por uma análise de variância (ANOVA) de 1 fator para o tipo de biovidro, e por uma

análise de variância de 1 fator para o tempo. Teste *post hoc* de Tukey para múltiplas comparações. A significância estatística foi 5%.

A mediana e intervalo interquartil do teste de permeabilidade dentinária foi calculado para todas as condições experimentais, e foi utilizado o teste de Friedman (para dados não paramétricos de medidas repetidas intragrupo em diferentes tempos). Caso encontradas diferenças significativas, as comparações múltiplas foram feitas com os pós teste Dunn ( $\alpha = 5\%$ ).

Realizou-se análise descritiva das imagens superficiais dos CP obtidas por microscopia eletrônica de varredura por efeito de campo, avaliando a presença/ausência de túbulos dentinários na superfície.

## 6 EXPERIMENTO 3

### 6.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E MATERIAIS UTILIZADOS

Foi realizada a indução cirúrgica de uma recessão gengival nos molares dos ratos, sendo um modelo animal experimental de hipersensibilidade dentinária (Dalmolin <sup>51</sup> 2018). Isto com o objetivo de simular uma situação clínica geralmente associada com a presença de HD, onde se apresenta uma exposição da porção cervical radicular, que em alguns casos apresenta perda de substância dentinária como o cimento e dentina radicular, com exposição dos túbulos dentinários ao meio bucal e conseqüentemente a manifestação da HD.

Foram utilizados 15 ratos (*Rattus Norvergicus albinus Wistar*), machos com 60 dias de idade, e peso entre 200-300 gramas. Os animais foram fornecidos pelo Biotério da UEPG. Foram mantidos sob condições controladas de iluminação artificial (12 horas claro/escuro), temperatura de  $22 \pm 2$  °C; e tinham acesso *ad libitum* à água e ração (Nuvilab® CR-1, Quimtia S.A., Colombo, PR, Brasil). Os animais eram mantidos em gaiolas de propileno e foram forradas com maravalha estéril que foi trocada a cada 2 dias, e eram mantidos um máximo de 4 animais dentro de cada gaiola durante a execução do experimento.

A composição e descrição dos materiais utilizados no experimento estão descritos na tabela 6 e o digrama do experimento na figura 7. O protocolo de pesquisa envolvendo o uso de animais foi aprovado pela Comissão de Ética em Uso de Animais (CEUA) da UEPG por meio do processo nº 039/2015 (Anexo B).

Tabela 6. Composição química dos materiais utilizados no experimento 3: biovidros experimentais e materiais comerciais\*.

Material	Composição
1 – Biovidro experimental + estrôncio (BvSr)	$\text{Na}_2\text{O}.1\text{CaO}.3\text{SiO}_2+6\text{wt.}\% \text{P}_2\text{O}_5 -5\text{wt.}\% \text{SrO}$
2 – Biovidro experimental + potássio (BvK)	$\text{Na}_2\text{O}.1\text{CaO}.3\text{SiO}_2+6\text{wt.}\% \text{P}_2\text{O}_5 -5\text{wt.}\% \text{K}_2\text{O}$
3 – Biosilicato® (Bs)	23.75 wt.% $\text{Na}_2\text{O}$ –23.75 wt.% $\text{CaO}$ –48.5 wt.% $\text{SiO}_2$ –4 wt.% $\text{P}_2\text{O}_5$
4 – Verniz cavitario (Verniz)	Nitrocelulose, acetato de etila e álcool anidro

\* Composição do material de acordo com o fabricante.

**Fonte:** A autora.

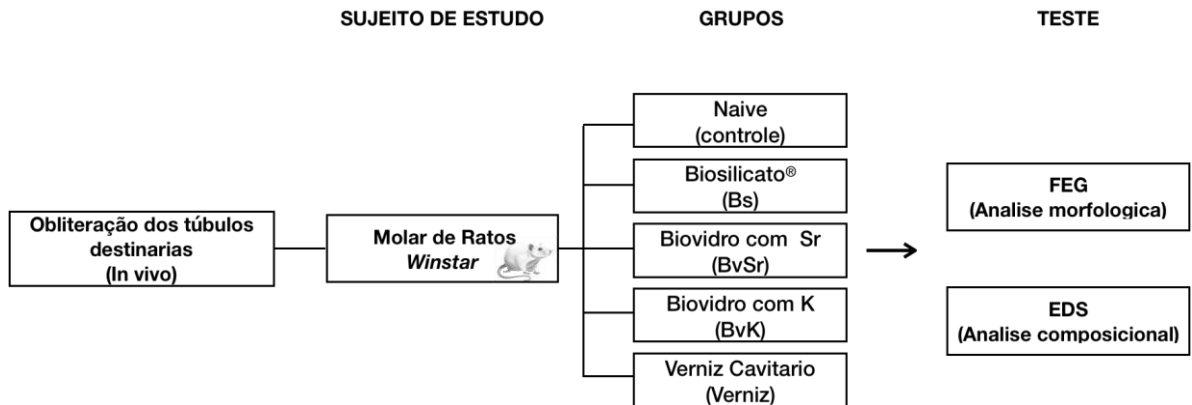


Figura 7. Fluxograma da sequência e descrição da linha do tempo seguida durante a execução do experimento.

**Fonte:** A autora.

## 6.2 INDUÇÃO DA RECESSÃO GENGIVAL

A indução da recessão gengival foi realizada mediante um procedimento cirúrgico sob anestesia geral do animal, aplicada através de injeção intraperitoneal de solução de hidrato de cloral à dose de 400mg/Kg (Vetec®, SigmaAldrich®, Duque de Caxias, Rio de Janeiro, Brasil), preparada em solução salina (NaCl 0,9%). Todos animais foram pesados em balança digital (SF-400, Brasil) antes de receber a anestesia. Todas as injeções foram realizadas com a solução à temperatura ambiente, e com pH corrigido para o intervalo entre 7,0 e 7,8. A concentração utilizada foi de 4% (40mg/mL) e a dose injetada, portanto, foi de 1mL a cada 100g de peso. Após a perda dos reflexos, foi realizada anestesia infiltrativa no local do procedimento cirúrgico (palato) com solução de cloridrato de mepivacaína 20mg/mL com epinefrina a 0,01mg/mL (Mepivalem® AD, Denstply Pharmaceutical, SP, Brasil). O fluxograma da fase experimental está descrito na figura 8.

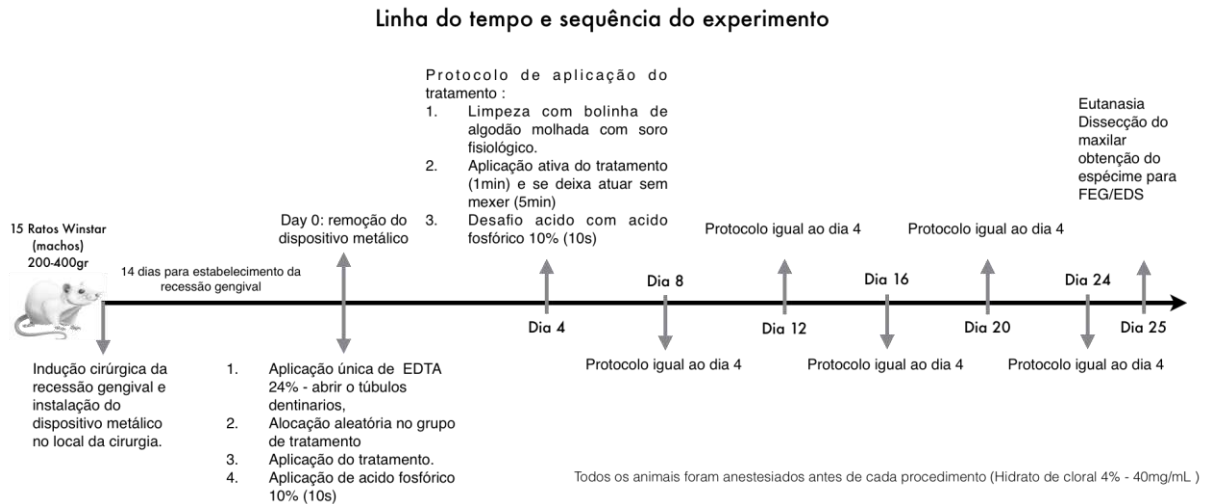


Figura 8. Fluxograma da seqüência e descrição da linha do tempo seguida durante a execução do experimento.

**Fonte:** A autora.

Antes de iniciar o procedimento cirúrgico foi medida o tamanho da coroa do dente desde a margem gengival até a oclusal com uma sonda periodontal milimetrada tipo Carolina do Norte (Hu-Friedy®, Chicago, EUA).

O procedimento cirúrgico foi iniciado com uma incisão a 2 mm da margem gengival na região disto-palatina do segundo molar superior esquerdo e se estendeu até a região mesial do primeiro molar. O colar gengival foi removido com microcinzel de Rhodes n°36/37 (Golgran®, São Caetano do Sul, SP, Brasil). Em seguida procedeu-se a realização da remoção de 1 mm de tecido ósseo na região palatina e mesial do primeiro molar, obtendo assim, a exposição da dentina radicular. Com o objetivo de manter a recessão gengival induzida, logo após a cirurgia foi instalado um dispositivo metálico constituído por duas partes: segmento de fio 75 metálico de CrNi (Fio Ortodôntico para Amarrilho CrNi 55.01.210, Morelli®, Sorocaba, São Paulo, Brasil) de 20 mm de comprimento, preso a um segmento de tela-malha de aço inoxidável (Tela Ortodôntica para Base – Malha 80 pontos/pol. – 35.11.001, Morelli®, Sorocaba, São Paulo, Brasil) de dimensões aproximadas de 3 mm X 6 mm. A tela-malha do dispositivo foi adaptada à região da recessão, e a região cervical do primeiro molar superior esquerdo foi contornada pelo fio metálico, sendo que este foi amarrado ao redor do dente, com o auxílio de pinça do tipo Mathieu (Golgran®, São Caetano do Sul, São Paulo, Brasil). As extremidades do fio foram unidas na região vestibular e adaptadas ao contorno do dente, a fim de evitar lesão na mucosa jugal dos animais (figura 9).

Este dispositivo foi mantido em posição durante 14 dias, com o objetivo de se estabelecer a lesão e evitar o recrescimento do tecido gengival na região. A dieta dos animais não foi modificada após cirurgia, os animais não foram submetidos a nenhum procedimento durante esse período de tempo e só eram colocados fora da gaiola para a troca da maravalha.

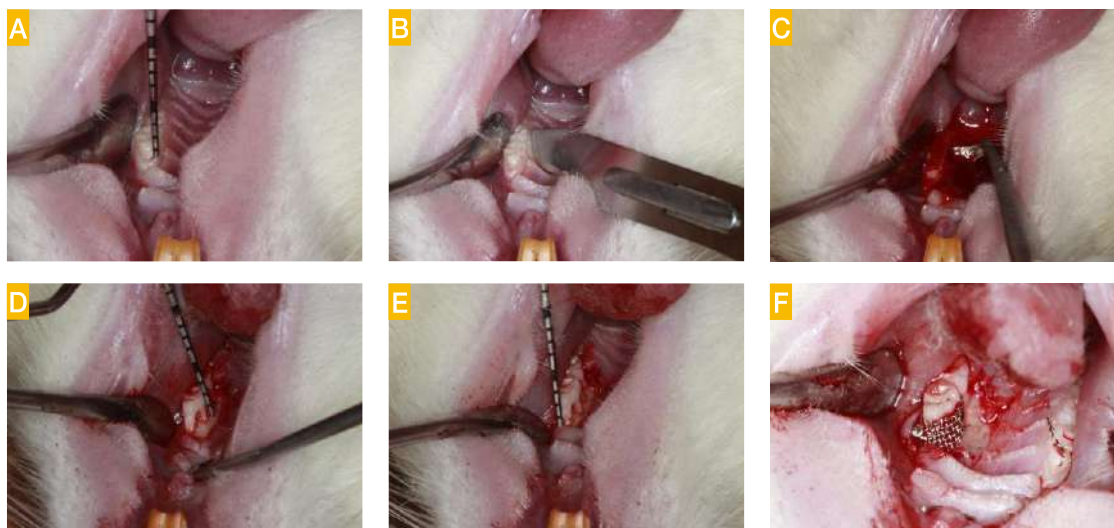


Figura 9. Sequencia do procedimento cirúrgico para criar a recessão gengival. (A) medição da profundidade clínica de sondagem; (B) incisão na mucosa palatina com lâmina de bisturi a 2 mm da margem gengival (C) remoção do tecido ósseo com cinzel; e (D) mensuração em palatino do defeito ósseo criado no primeiro molar; (E) mensuração em mesial do defeito ósseo criado no primeiro molar; (F) dispositivo para manter a recessão instalado (tela-malha + fio metálico).

**Fonte** A autora.

### 6.2.1 Remoção do dispositivo

No dia 14 após a cirurgia o dispositivo foi removido sob anestesia geral (conforme protocolo previamente descrito), e se deu início ao tratamento da recessão gengival produzida na cirurgia (figura 10). Todos os grupos nos quais foi realizado a cirurgia de recessão gengival foram tratados com EDTA 24% (Reatec®, Reagen Ltda, Colombo, Paraná, Brasil), aplicado ativamente com microbrush descartável (KG Brush Regular, KG Sorensen®, SP, Brasil) na superfície radicular exposta durante 3 min, com o objetivo de remover o biofilme, promover a abertura dos túbulos dentinários e aumentar a permeabilidade da dentina. Esse procedimento foi realizado uma única vez durante a condução do experimento. Os molares

superiores direitos não receberam nenhum tratamento cirúrgico e foi mantido hígido e considerado como um controle interno.

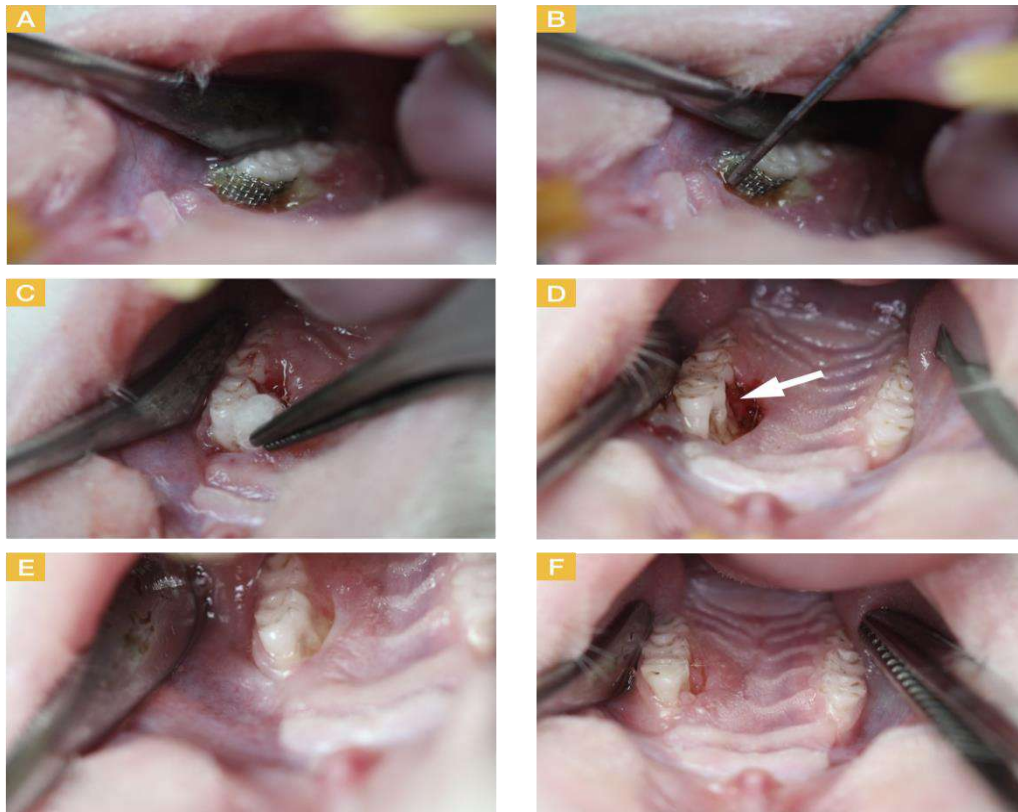


Figura 10. Sequencia da remoção da tela e o fio metálico. (A) tela e fio posicionados ao redor do molar superior esquerdo 14 dias após cirurgia; (B) Remoção de restos alimentícios; (C) limpeza da superfície dental com bolinha de algodão; e (D) fotografia mostrando o maxilar superior, a seta indica a recessão criada na região palatina do primeiro molar superior esquerdo e se observa o lado contralateral não tratado; (E) recessão após 8 dias de remoção da tela; (F) recessão após 20 dias de remoção da tela.

**Fonte:** A autora.

### 6.3 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os animais foram pesados no começo do experimento e distribuídos aleatoriamente nos 5 grupos experimentais com (n=3) para cada grupo. Os grupos e a descrição do tratamento estão apresentados na tabela 7. O grupo nnaive é considerado um controle negativo, este grupo foi submetido as mesmas condições que os grupos experimentais, porém não foi realizado o procedimento cirúrgico e não recebeu tratamento, no entanto, recebeu anestesia nas mesmas etapas que os



grupos experimentais. Isto foi realizado com o objetivo para minimizar os vieses na comparação entre os grupos.

Tabela 7. Descrição dos grupos (experimental e controle) e numero (n) de animais por grupo.

<b>Grupo</b>	<b>Tratamento</b>	<b>n</b>
Naive (N)	Aplicação de soro fisiológico na superfície dentaria com microbrush durante 1 min.	3
Verniz (Vz)	Aplicação ativa de verniz na região da recessão com microbrush durante 1 min; sendo material mantido por mais 5 min no local livre de umidade.	3
Biosilicato® (Bv - Bs)	Aplicação ativa de verniz + de biovidro na região da recessão .com micro-brush durante 1 min; sendo material mantido por mais 5 min no local livre de umidade.	3
Biovidro com Estrôncio (Bv - Sr)	Aplicação ativa de de verniz + de biovidro com Sr na região da recessão .com micro-brush durante 1 min; sendo material mantido por mais 5 min no local livre de umidade.	3
Biovidro com Potássio (Bv - K)	Aplicação ativa de de verniz + de biovidro com K na região da recessão .com micro-brush durante 1 min; sendo material mantido por mais 5 min no local livre de umidade.	3
Total	- - -	15

**Fonte:** A autora.

### 6.3.1 Protocolo de tratamento

O tratamento foi realizado uma vez a cada 4 dias durante 28 dias, para um total de 7 aplicações. Previamente a cada aplicação, os animais foram anestesiados (conforme protocolo previamente descrito). A área teste submetida ao tratamento com uma proporção (verniz/biovidro) foi padronizada para todos os grupos sendo calculada na porcentagem de 5% (mg/mL).

1. Limpeza da superfície dental com bolinha de algodão e soro fisiológico para remoção de matéria alba.
2. Aplicação ativa com microbrush (KG Brush Regular, KG Sorensen®, SP, Brasil), durante 1 min, sendo material mantido por mais 5 min no local livre de umidade.

3. Aplicação de ácido fosfórico 10% com o uma bolinha de algodão, com o objetivo de simular fatores que estimulam ou induzem a sensibilidade.
4. O animal era levado a recuperação até passar o efeito anestésico.

A eutanásia dos animais foi realizada por sobre\dose de anestésico hidrato de cloral 4%, segundo o CONCEA (2015), considera como métodos e agentes de eutanásia recomendáveis para roedores e posterior deslocamento cervical. Em seguida foi realizada dissecação do maxilar superior e remoção do tecido e foi separada a hemi-maxila esquerda da direita. Os dentes foram armazenados em um refrigerador a -20°C, sendo preparados para análise morfológica microscopia eletrônica (FEG) e análise composicional (EDS), teste descritos previamente neste trabalho (item 5.3.4 - 5).

## 7 RESULTADOS

Os resultados são apresentados na mesma sequência em que foram descritos os experimentos na secção de material e métodos.

### 7.1 EXPERIMENTO 1 (Propriedades biológicas)

#### 7.1.1 Testes de Citotoxicidade

A Figura 11 mostra os resultados de citotoxicidade in vitro dos extratos de biovidro em cultura de células de linhagem fibroblastos NIH-3T3 no ensaio de MTT após 24 h. Na comparação dos grupos com o DMEM podemos observar que na concentração 5 µg/mL nenhum dos extratos de biovidro apresentou citotoxicidade. Nas concentrações 50 e 100 µg/mL apenas o grupo BvSr diminuiu a viabilidade celular significativamente. Na concentração de 500 µg/mL os extratos de Bs, BvSr e BvK reduziram significativamente. E a partir das concentrações 1000 µg/mL todos os extratos de biovidro apresentaram redução significativa na viabilidade celular, porém na concentração de 10000 µg/mL o BvSr apresentou a porcentagem de viabilidade mais baixa com um 30% sendo estatisticamente diferente do grupo BvSrK.

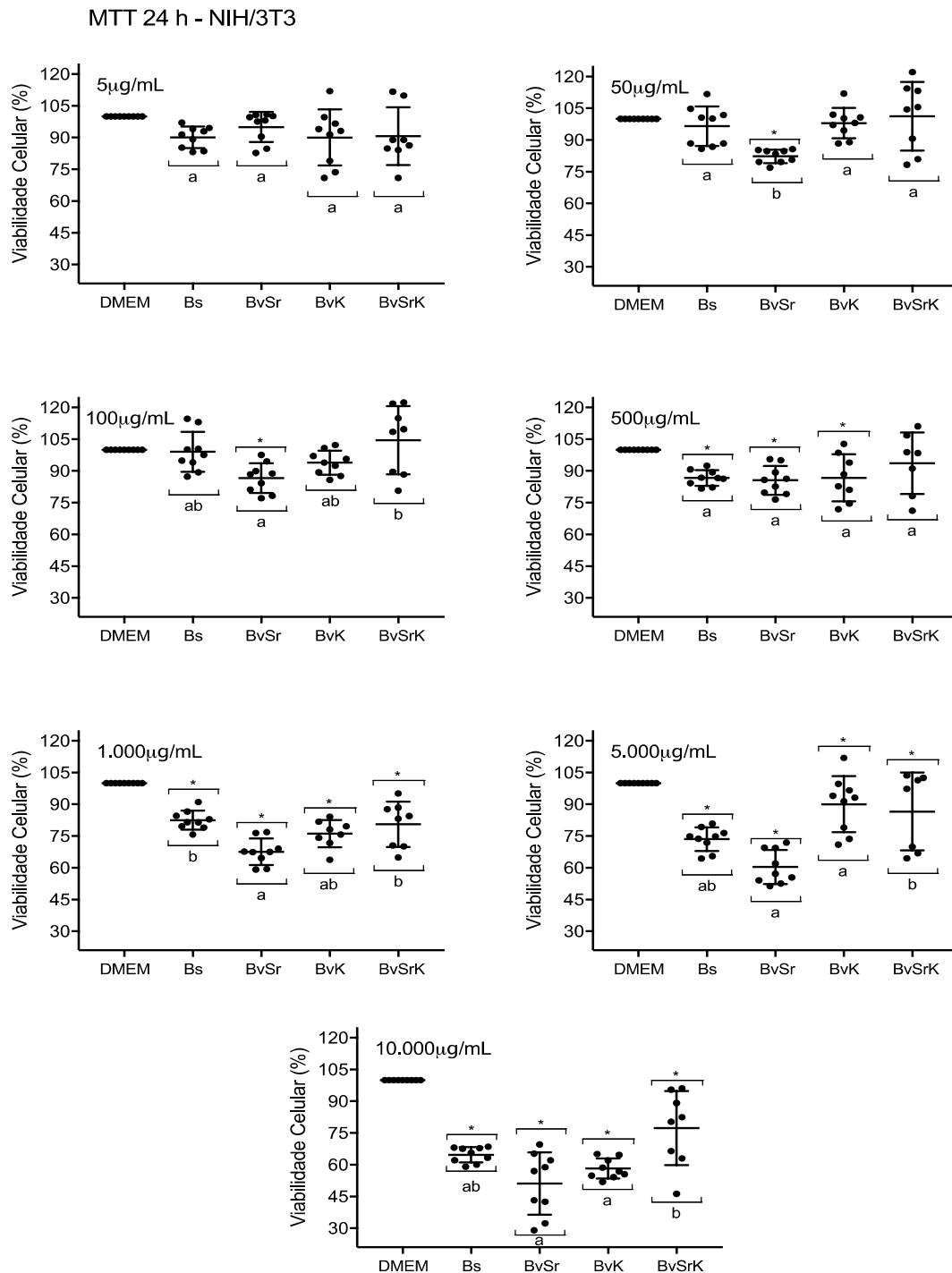


Figura 11. Valores de absorbância representando a viabilidade celular (%) obtidos pelo ensaio de MTT em células de linhagem NIH-3T3 após 24 h de incubação com os extratos dos biovidro, nas diferentes concentrações (5, 50, 100, 500, 1000, 5000 e 10000 µg/mL). Os (\*) indicam diferença significativa em comparação com o DMEM (ANOVA,  $p < 0,05$ ). Letras iguais indicam resultados estatisticamente similares entre os tratamentos nessa concentração (ANOVA com pós teste de Tukey,  $p \geq 0,05$ ). Pontos representam os elementos amostrais e as linhas a média e desvio padrão. **Fonte:** A autora.

A Figura 12 mostra os resultados de citotoxicidade *in vitro* dos extratos de biovidro em cultura de células de linhagem fibroblastos NIH-3T3 no ensaio de MTT após 48 h. Ao comparar os grupos em relação ao DMEM observamos que os biovidros apresentaram um aumento na viabilidade celular nas concentrações menores, sendo o grupo Bs que apresentou a maior viabilidade dos materiais até a concentração de 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Nas concentrações 1000, 5000 e 10000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , todos os grupos tiveram redução significativa da viabilidade celular em relação ao DMEM.

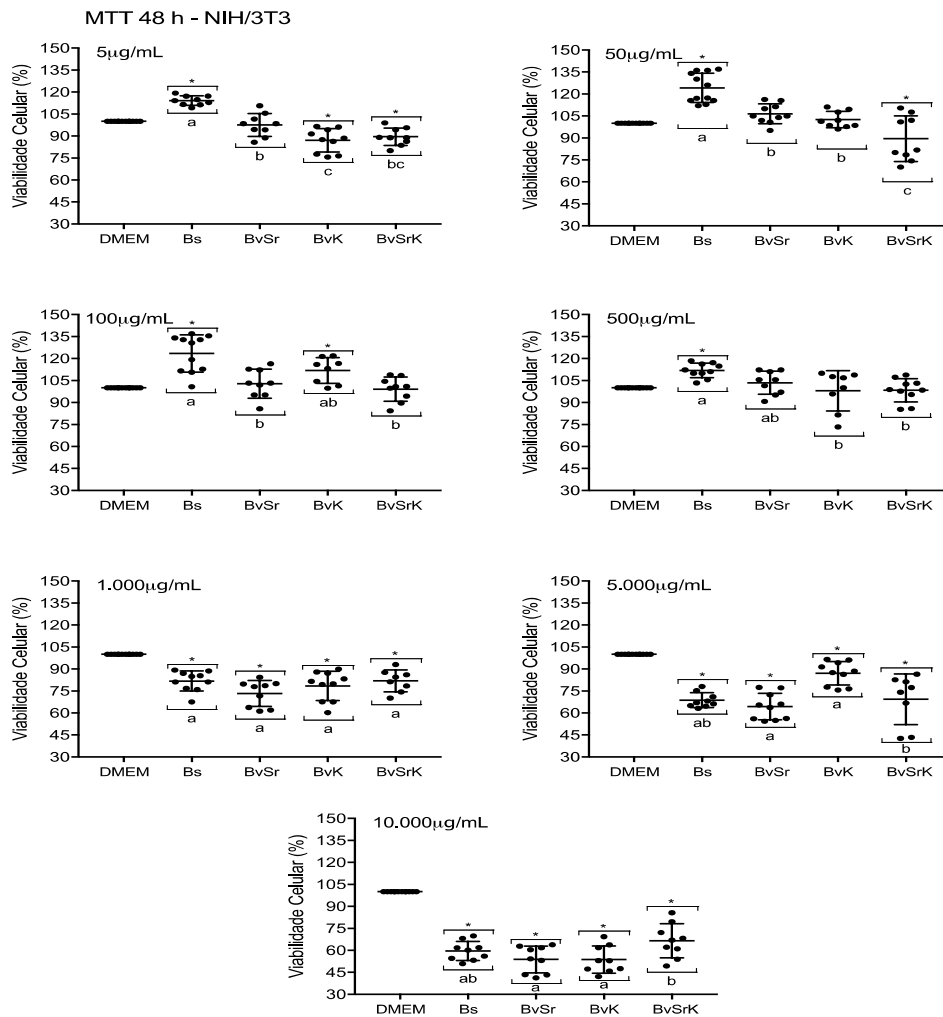


Figura 12. Valores de absorbância representado a viabilidade celular (%) obtidos pelo ensaio de MTT em células de linhagem NIH-3T3 após 48 h de incubação com os extratos dos biovidro, nas concentrações (5, 50, 100, 500, 1000, 5000 e 10000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Os (\*) indicam diferença significativa em comparação com o DMEM (ANOVA,  $p < 0.05$ ). Letras iguais indicam resultados estatisticamente similares entre os tratamentos nessa concentração (ANOVA com pós teste de Tukey,  $p \geq 0,05$ ). Pontos representam os elementos amostrais e as linhas a média e desvio padrão. **Fonte:** A autora.

A figura 13 mostra os resultados de citotoxicidade in vitro dos extratos de biovidro em células indiferenciadas de polpa humana (CIPH) ensaio de MTT 24 h. A comparação dos grupos nas diferentes concentrações com o DMEM pode-se observar que nas concentrações 5, 50, 100 e 5000  $\mu\text{g/mL}$  nenhum dos grupos apresentou citotoxicidade. Nas concentrações 500 1000  $\mu\text{g/mL}$  apenas o grupo BvK teve redução significativa da viabilidade celular em relação ao DMEM. Na concentração de 10000  $\mu\text{g/mL}$  todos os grupos diminuíram significativamente a viabilidade celular em relação ao DMEM.

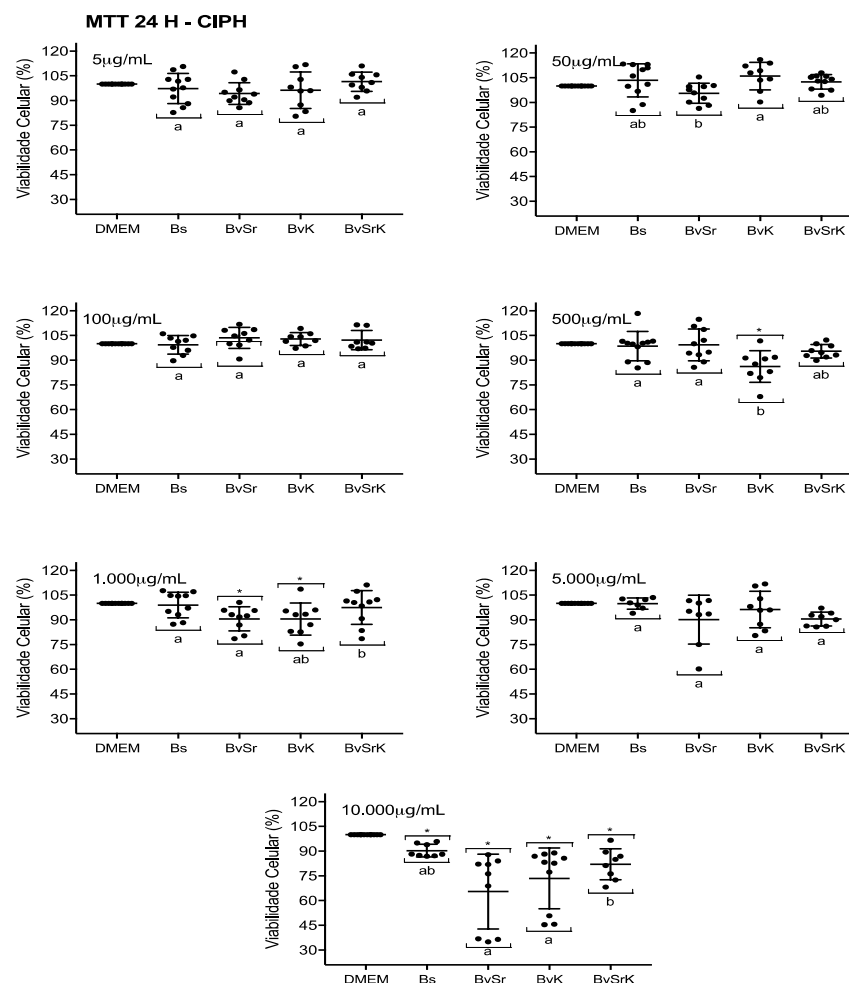


Figura 13. Valores de absorbância representado a viabilidade celular (%) obtidos pelo ensaio de MTT em células CIPH após 24 h de incubação com os extratos dos biovidro, nas diferentes concentrações (5, 50, 100, 500, 1000, 5000 e 10000  $\mu\text{g/mL}$ ). Os (\*) indicam diferença significativa em comparação com o DMEM (ANOVA,  $p < 0.05$ ). Letras iguais indicam resultados estatisticamente similares entre os tratamentos nessa concentração (ANOVA com pós teste de Tukey,  $p \geq 0,05$ ). Pontos representam os elementos amostrais e as linhas a média e desvio padrão.

**Fonte:** A autora.

A Figura 14 mostra os resultados de citotoxicidade *in vitro* dos extratos de biovidro em células indiferenciadas de polpa humana (CIPH) ensaio de MTT 48 h. Observamos que com relação ao DMEM nas concentrações 50 e 100  $\mu\text{g/mL}$  nenhum dos biovidros apresentou citotoxicidade. Os grupos BvSr e BvK apresentaram menor redução da viabilidade celular em diferentes concentrações. O grupo Bs não apresentou citotoxicidade na maioria das concentrações. Na concentração 10000  $\mu\text{g/mL}$  todos os grupos apresentaram citotoxicidade.

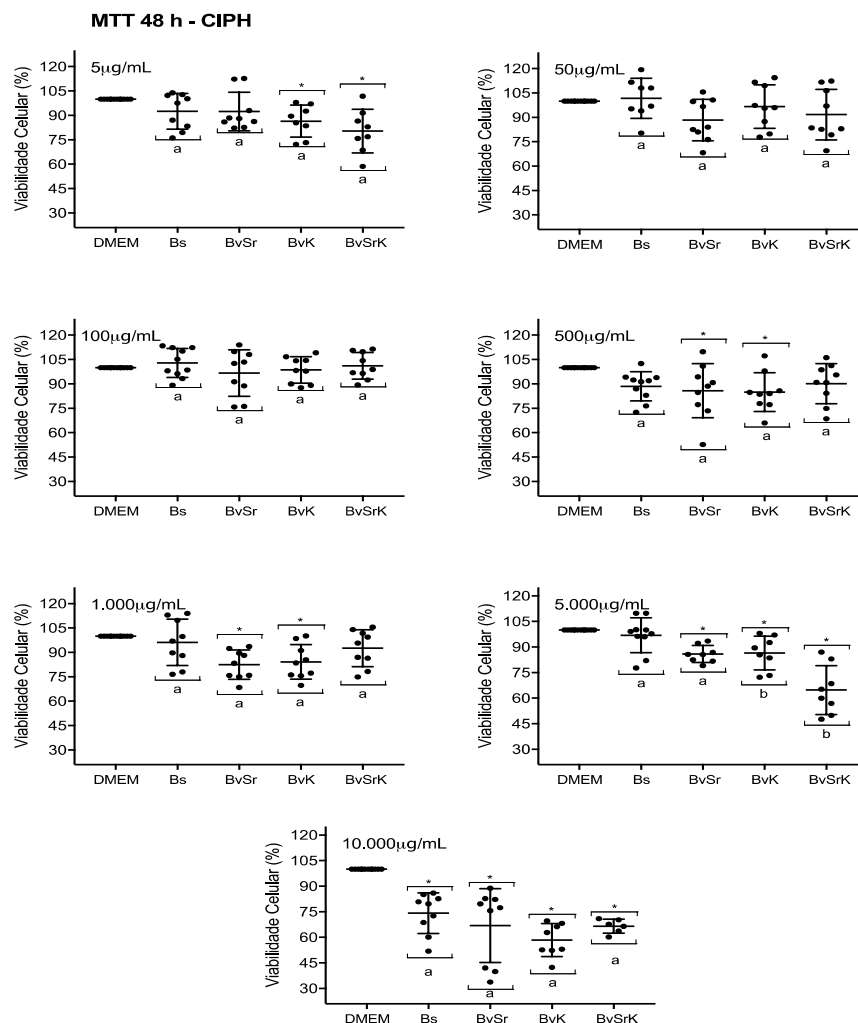


Figura 14. Valores de absorbância representado a viabilidade celular (%) obtidos pelo ensaio de MTT em células CIPH após 48 h de incubação com os extratos dos biovidro, nas diferentes concentrações (5, 50, 100, 500, 1000, 5000 e 10000  $\mu\text{g/mL}$ ). Os (\*) indicam diferença significativa em comparação com o DMEM (ANOVA,  $p < 0.05$ ). Letras iguais indicam resultados estatisticamente similares entre os tratamentos nessa concentração (ANOVA com pós teste de Tukey,  $p \geq 0,05$ ). Pontos representam os elementos amostrais e as linhas a média e desvio padrão.

**Fonte:** A autora.

A figura 15 apresenta os resultados de citotoxicidade in vitro dos extratos de biovidro em cultura de células de linhagem fibroblastos NIH-3T3 no ensaio de VN após 24 h. Ao comparar os grupos nas diferentes concentrações pode-se observar que em relação ao DMEM: na concentração 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  os grupos Bs e BvSrK diminuíram a viabilidade celular significativamente. Nas concentrações de 50,100 e 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  apenas o grupo BvSrK teve uma redução significativa na viabilidade celular. Na concentração de 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  os grupos Bs, BvK e BvSrK houve redução significativa da viabilidade e nas concentrações 5000 e 10000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  todos os grupos diminuíram significativamente a viabilidade celular em relação ao DMEM.

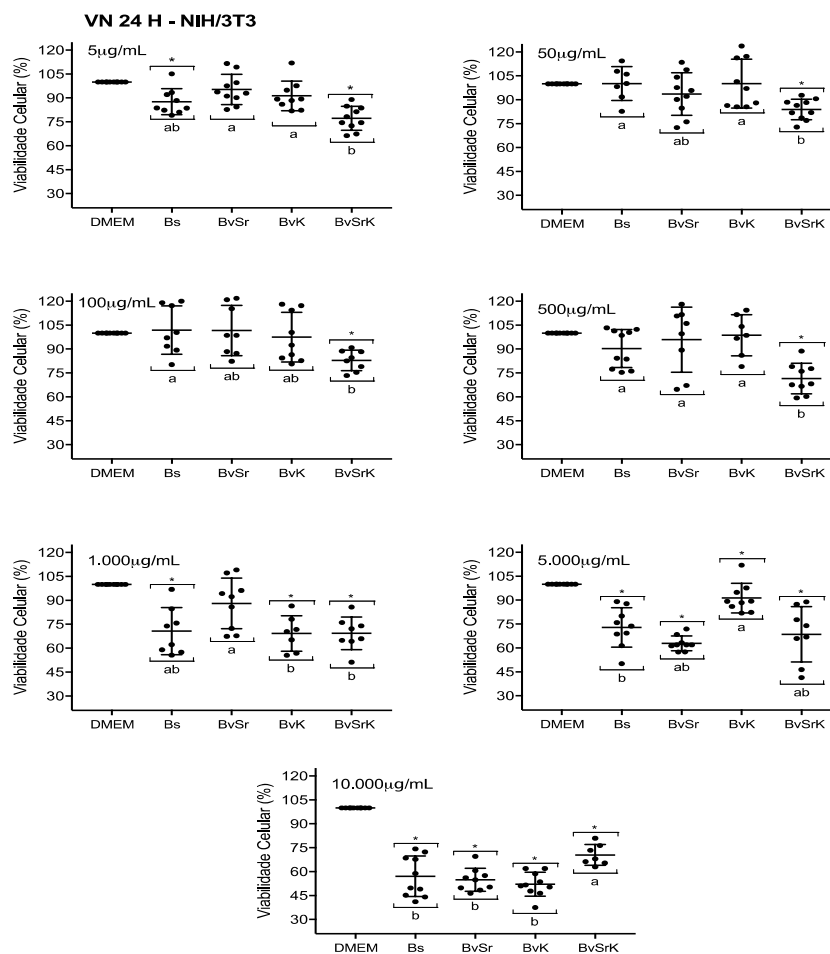


Figura 15. Valores de absorbância representado a viabilidade celular (%) obtidos pelo teste de VN em células CIPH após 24 h de incubação com os extratos dos biovidro, nas concentrações (5, 50, 100, 500, 1000, 5000 e 10000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Os (\*) indicam diferença significativa em comparação com o DMEM (ANOVA,  $p < 0.05$ ). Letras iguais indicam resultados estatisticamente similares entre os tratamentos nessa concentração (ANOVA com pós teste de Tukey,  $p \geq 0,05$ ). Pontos representam os elementos amostrais e as linhas a média e desvio padrão.

**Fonte:** A autora.



A figura 16 mostra os resultados de citotoxicidade dos extratos de biovidro em células fibroblastos linhagem NIH-3T3 no ensaio de VN após 48 h. Ao realizar a comparação dos grupos nas diferentes concentrações com o DMEM e pode-se observar que na concentração 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  o grupo BvSr e apresentam uma redução significativa na viabilidade celular. A partir da concentração de 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  todos os grupos diminuíram significativamente a viabilidade celular em relação ao DMEM. Nas concentrações de 100, 500 e 5000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  todos os grupos tiveram uma viabilidade semelhante.

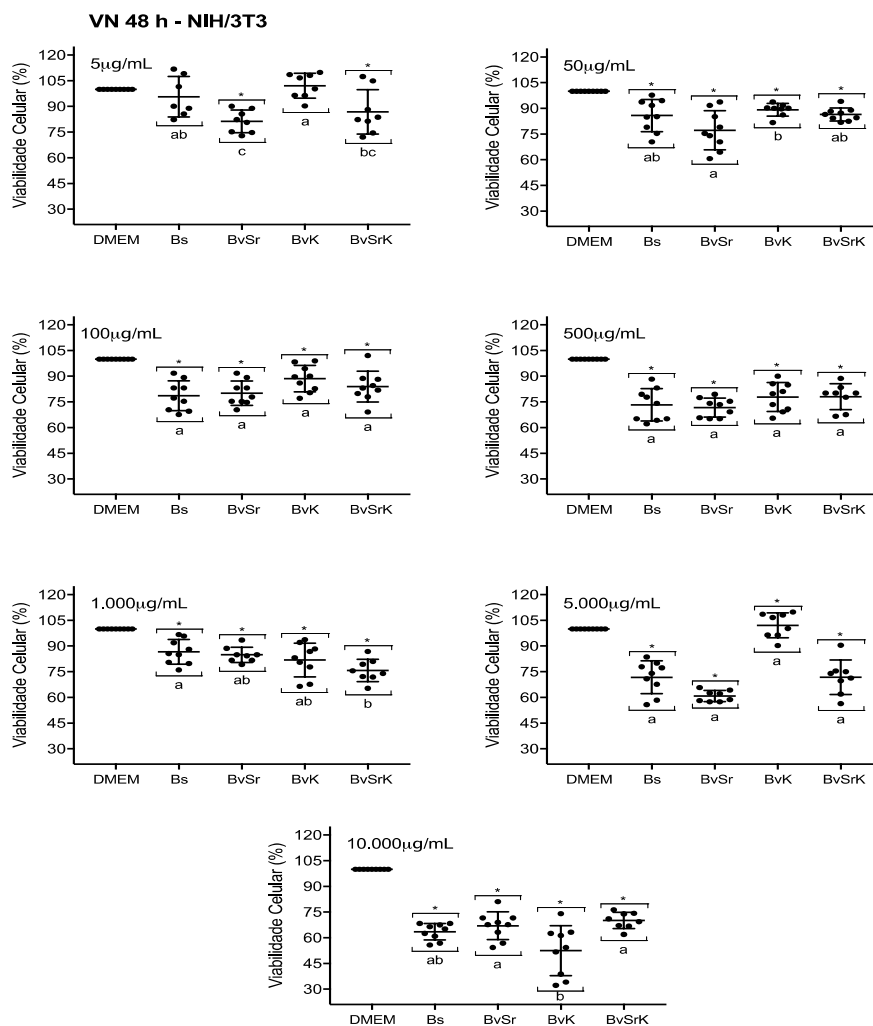


Figura 16. Valores de absorbância representado a viabilidade celular (%) obtidos pelo teste de VN em células CIPH após 48 h de incubação com os extratos dos biovidro, nas concentrações (5, 50, 100, 500, 1000, 5000 e 10000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Os (\*) indicam diferença significativa em comparação com o DMEM (ANOVA,  $p < 0.05$ ). Letras iguais indicam resultados estatisticamente similares entre os tratamentos nessa concentração (ANOVA com pós teste de Tukey,  $p \geq 0,05$ ). Pontos representam os elementos amostrais e as linhas a média e desvio padrão.

**Fonte:** A autora.

### 7.1.2 *Análise morfológica*

As figuras 17 e 18 apresentam os resultados da análise morfológica após tratamento com os diferentes biovidros, realizado na cultura celular primária CIPH após 24 e 48 h respectivamente; e as figuras 19 e 20 apresentam os resultados na linhagem células NIH/3T3. O grupo controle negativo (para morte celular) foram as células apenas com o DMEM suplementado com o SBF, o citrato mostra as características morfológicas de uma morte celular associada a um efeito citotóxico. Ambos os tipos de células foram tratados da mesma forma.

## Análise morfológica CIHP 24 h

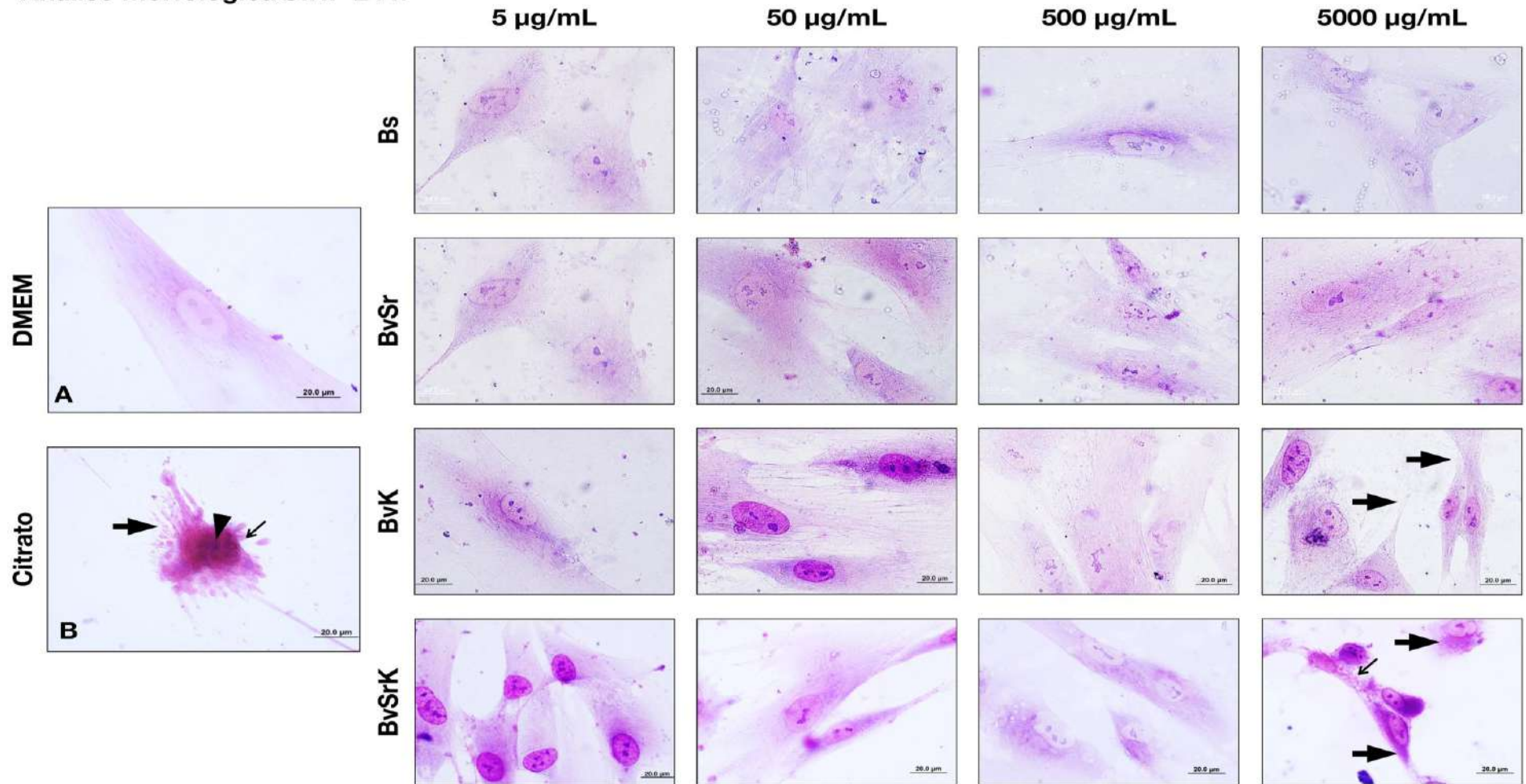


Figura 17. Análise morfológica da linhagem primária CIPH após 24 h de tratamento. A – Controle negativo (para morte celular), células incubadas apenas com o meio DMEM suplementado com SFB e antibióticos. As células apresentam morfologia típica, citoplasma alongado e aderida ao substrato, núcleo de cor mais roxo com componentes nucleicos definidos. B – Controle positivo (para morte celular) de alteração morfológica, perda de adesão ao substrato, componentes citoplasmáticos e núcleos não definidos, células incubadas com citrato. É possível observar a perda de adesão ao substrato (→), presença de blebs (→) e condensação de cromatina (▲). Linhas tratamentos aplicados (Bs, BvSr, BvK e BvSrK) e colunas são as concentrações utilizadas (5, 50, 500 e 5000 µg/mL). Não foram observadas alterações morfológicas nesses tratamentos. Coloração de MayGrünwald-Giensa- aumento de 1000x.

Fonte: A autora.

## Análise morfológica CIHP 48 h

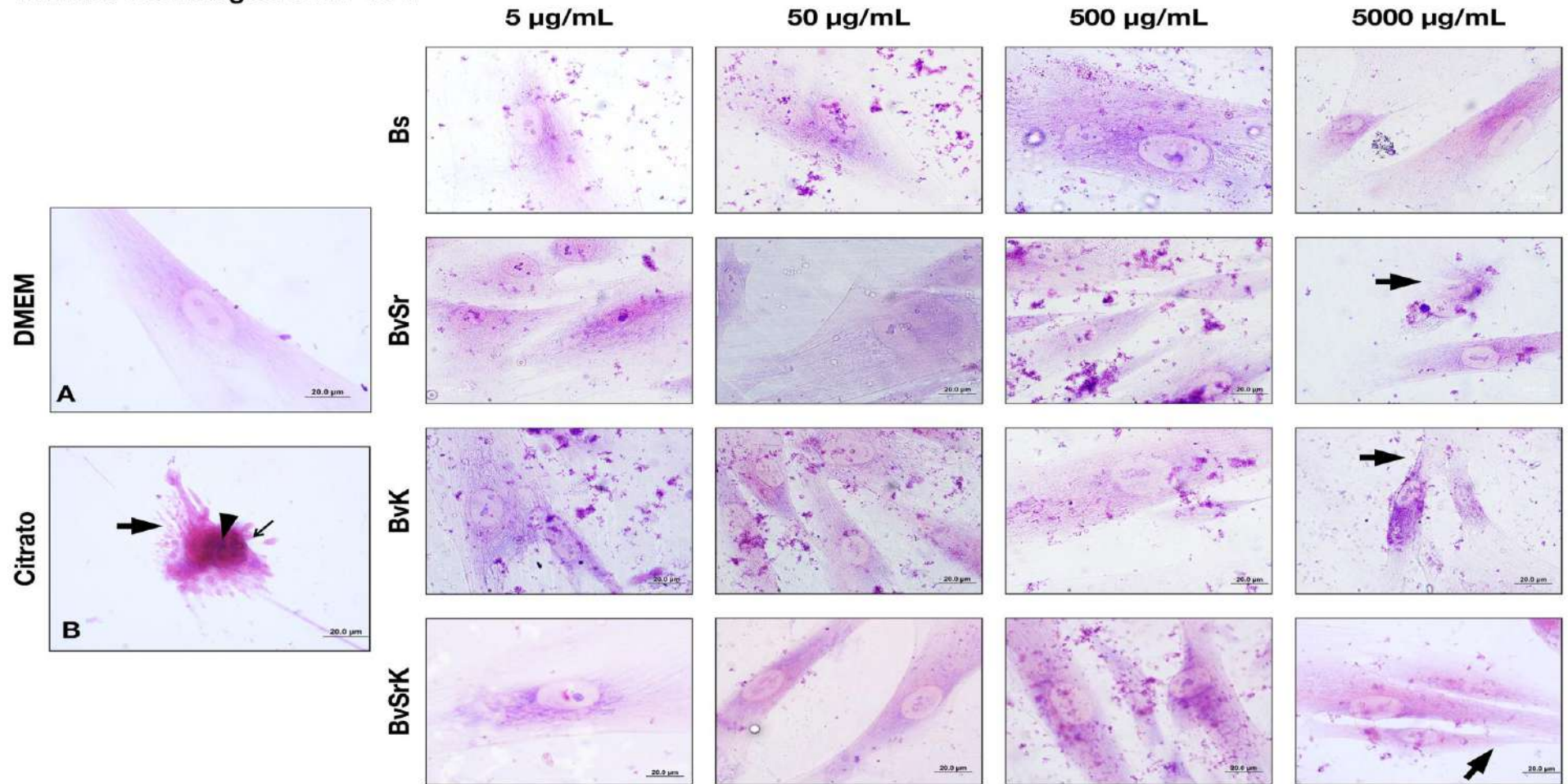


Figura 18. Análise morfológica da linhagem primária CIPH após 48 h de tratamento. A – Controle negativo (para morte celular), células incubadas apenas com o meio DMEM suplementado com SFB e antibióticos. As células apresentam morfologia típica, citoplasma alongado e aderida ao substrato, núcleo de cor mais roxo com componentes nucleicos definidos. B – Controle positivo (para morte celular), de alteração morfológica, perda de adesão ao substrato, componentes citoplasmáticos e núcleos não definidos, células incubadas com citrato. É possível observar a perda de adesão ao substrato (➡), presença de blebs (➔) e condensação de cromatina (▲). Linhas tratamentos aplicados (Bs, BvSr, BvK e BvSrK) e colunas são as concentrações utilizadas (5, 50, 500 e 5000 µg/mL). Não foram observadas alterações morfológicas nesses tratamentos. Coloração de MayGrünwald-Giensa- aumento de 1000x.

Fonte: A autora.

## Análise morfológica 3T3 24 h

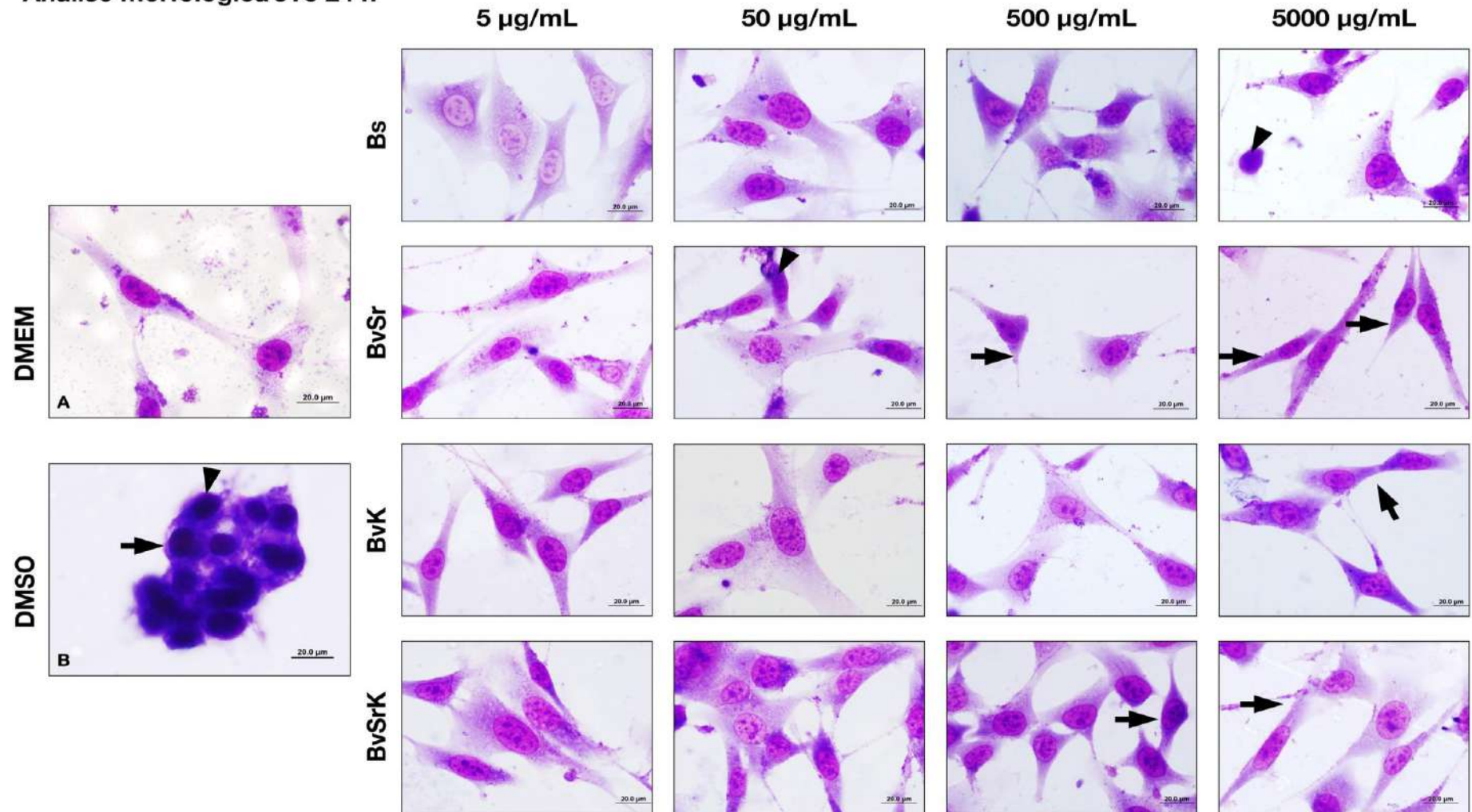


Figura 19. Análise morfológica da linhagem NIH/3T3 após 24 h de tratamento. A – Controle negativo (para morte celular), células incubadas apenas com o meio DMEM suplementado com SFB e antibióticos. As células apresentam morfologia típica, as células são bipolares ou multipolares, têm formas alongadas e crescem ligadas a um substrato. B – Controle positivo de alteração morfológica, perda de adesão ao substrato, componentes do núcleo não definidos, células incubadas com citrato. É possível observar a perda de adesão ao substrato (→), presença de blebs (⇨) e condensação de cromatina (▲). Linhas tratamentos aplicados (Bs, BvSr, BvK e BvSrK) e colunas são as concentrações utilizadas (5, 50, 500 5 5000µg/mL). Não foram observadas alterações morfológicas nesses tratamentos. Coloração de MayGrünwald-Giensa-aumento de 1000x.

Fonte: A autora.

## Análise morfológica 3T3 48 h

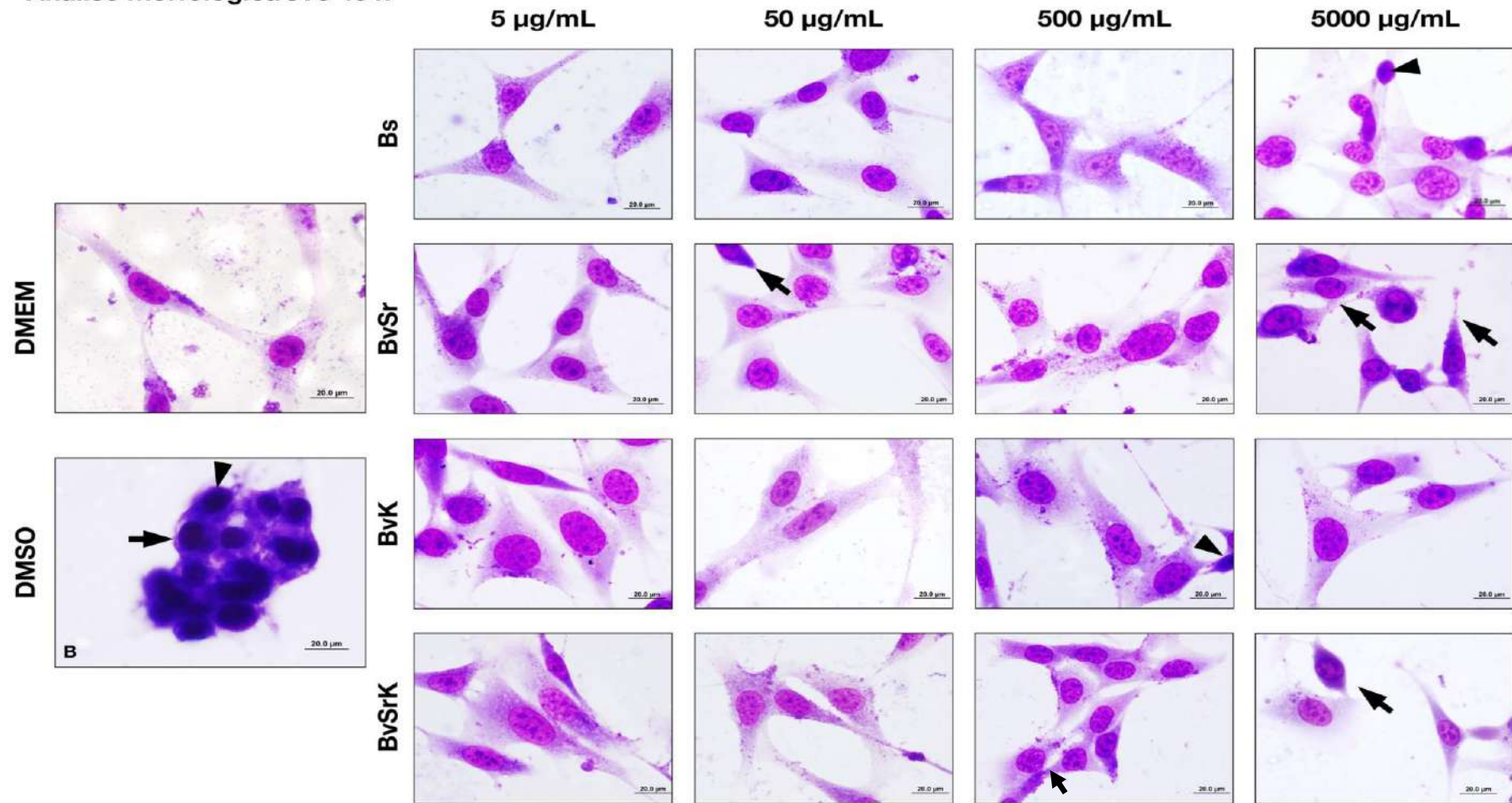


Figura 20. Análise morfológica da linhagem NIH/3T3 após 24 h de tratamento. A – Controle negativo (para morte celular), células incubadas apenas com o meio DMEM suplementado com SFB e antibióticos. As células apresentam morfologia típica, as células são bipolares ou multipolares, têm formas alongadas e crescem ligadas a um substrato. B – Controle positivo de alteração morfológica, perda de adesão ao substrato, componentes do núcleo não definidos, células incubadas com citrato. É possível observar a perda de adesão ao substrato (→), presença de blebs (→) e condensação de cromatina (▲). Linhas tratamentos aplicados (Bs, BvSr, BvK e BvSrK) e colunas são as concentrações utilizadas (5, 50, 500 e 5000 µg/mL). Não foram observadas alterações morfológicas nesses tratamentos. Coloração de MayGrünwald-Giemsa aumento de 1000x.

Fonte: A autora.

## 7.2. EXPERIMENTO 2 (propriedades mecânicas e físicas na dentina)

### 7.2.1 Microdureza Vickers (MD)

A Tabela 8 mostra as comparações entre os grupos (colunas) e intragrupo (linha) para o teste de MD. Na comparação intergrupos observa-se que após aplicação de EDTA todos os CP apresentaram uma diminuição da MD com respeito aos valores iniciais. Após 24 h todos os materiais aumentaram os valores de MD sendo significativamente maiores nos grupos Biosilicato®, BvK e BvSrK. Após escovação o grupo Verniz apresentou uma redução significativa da MD em relação aos demais materiais.

Tabela 8. Médias e desvios-padrão dos dados de microdureza Vickers, obtidos por cada grupo em cada tempo de avaliação. (\*)

Grupos	Tempos de Avaliação			
	Inicial	EDTA	24 h	Escovação
Biosilicato®	60,26 ± 18,23 A,ab	46,91 ± 11,70 AB,b	68,85 ± 14,86 AB,a	47,69 ± 3,46 AB,b
BvSr	51,23 ± 9,80 A,a	49,82 ± 8,81 A,a	52,72 ± 4,04 B,a	52,90 ± 8,13 A,a
BvK	62,87 ± 8,94 A,a	44,31 ± 4,00 AB,b	66,95 ± 8,86 AB,a	49,29 ± 5,05 AB,b
BvSrK	55,65 ± 11,83 A,b	51,40 ± 3,89 A,b	75,40 ± 13,88 A,a	56,71 ± 8,52 A,b
Verniz	56,16 ± 11,14 A,a	37,08 ± 5,00 B,b	57,07 ± 8,42 B,a	42,23 ± 6,40 B,b

(\*) As comparações realizadas dentro de cada coluna (intergrupo) estão indicadas só por letras maiúsculas. As comparações realizadas dentro de cada linha (intragrupo) estão indicadas só por letras minúsculas. Para comparação letras iguais indicam resultados estatisticamente similares (ANOVA de uma via, pós teste Tukey,  $p \geq 0,05$ ).

**Fonte:** A autora.

### 7.2.2 Rugosidade superficial (RS)

A Tabela 9 apresenta as comparações intergrupos (colunas) e intragrupo (linhas) para RS. Na comparação intergrupo, o Biosilicato® apresentou diferenças em relação aos demais grupo nos valores iniciais, no entanto, após a aplicação do EDTA houve uma redução da RS, deixando a superfície semelhante entre eles. Após 24 h, todos os grupos tratados com biovidro tiveram um aumento da RS, sendo significativo em comparação ao Verniz. Com a escovação observamos novamente uma redução da RS, sendo que o Biosilicato e o BvSrK mostraram diferença

significativa em relação ao Verniz. Nas análises intragrupo, o Biosilicato®, BvSr e BvK apresentaram um aumento da RS tanto após 24 h quanto depois da escovação.

Tabela 9. Médias e desvios-padrão dos dados de rugosidade superficial obtidos por cada grupo em cada tempo de avaliação. (\*)

Grupos	Tempos de Avaliação			
	Inicial	EDTA	24 h	Escovação
<b>Biosilicato®</b>	0,32 ± 0,18 A,b	0,12 ± 0,05 A,b	3,12 ± 1,05 B,a	2,93 ± 0,98 A,a
<b>BvSr</b>	0,06 ± 0,03 B,c	0,09 ± 0,04 A,c	2,75 ± 0,92 B,a	1,59 ± 0,73 AB,b
<b>BvK</b>	0,13 ± 0,06 B,c	0,09 ± 0,04 A,c	4,75 ± 0,55 A,a	2,94 ± 1,95 A,b
<b>BvSrK</b>	0,08 ± 0,05 B,b	0,12 ± 0,07 A,b	3,08 ± 1,73 B,a	1,70 ± 1,71 AB,ab
<b>Verniz</b>	0,06 ± 0,02 B,b	0,11 ± 0,07 A,b	0,11 ± 0,06 C,b	0,50 ± 0,29 B,a

(\*) As comparações realizadas dentro de cada coluna (intergrupo) estão indicadas só por letras maiúsculas. As comparações realizadas dentro de cada linha (intragrupo) estão indicadas só por letras minúsculas. Para comparação letras iguais indicam resultados estatisticamente similares (ANOVA de uma via, pós teste Tukey,  $p \geq 0,05$ ).

**Fonte:** A autora.

### 7.2.3 Permeabilidade dentinária (PD)

A Figura 21 mostra as comparações entre os grupos da PD (condutividade  $L_p$ -  $\mu\text{l}/\text{min} \cdot \text{cmH}^2\text{O} \cdot \text{cm}^2$ ) dos espécimes de dentina nos diferentes tempos de avaliação. Ao realizar a análise da PD Inicial do grupo Biosilicato® apresentou diferenças em relação aos demais grupos. Após EDTA a PD aumentou em todos os grupos sendo significativo para o Biosilicato®. Após 24 h todos os grupos apresentaram menor PD, sendo significativa para o BvK. Na PD após escovação observa-se que todos os grupos foram capazes de manter o efeito na redução da PD, sendo significativamente menor no grupo BvSrK.



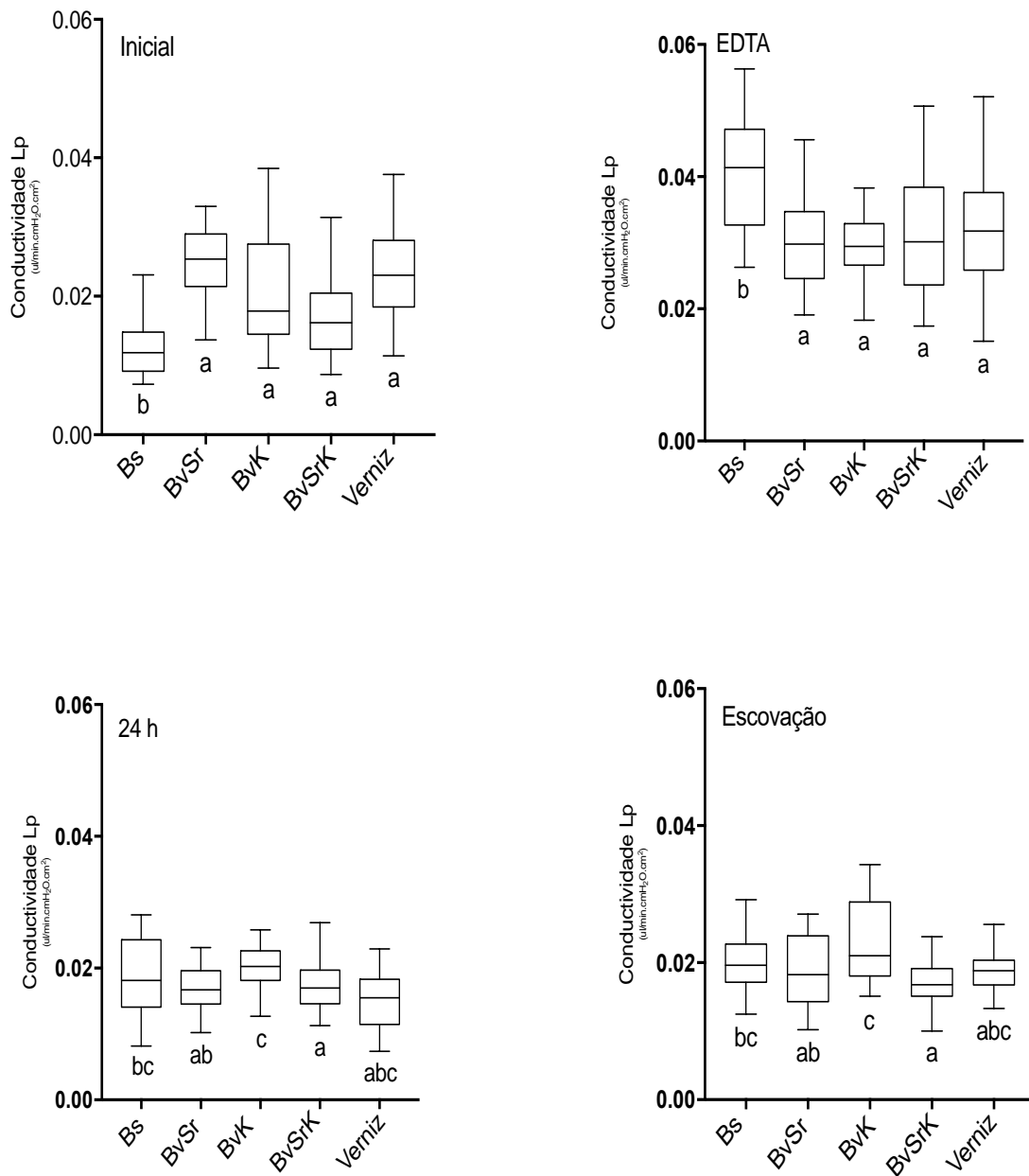


Figura 21. Análise da permeabilidade dentinária nos diferentes tempos de avaliação (inicial, após EDTA, após 24h e após escovação). Letras iguais indicam resultados estatisticamente similares entre os grupos no respectivo tempo de avaliação. (Kruskal-Wallis; Dunn's test,  $p \geq 0,05$ ). As linhas representam os valores mediana, e o valor máximo/mínimo.

**Fonte:** A autora.

#### 7.2.4 Microscopia eletrônica de varredura por efeito de campo (FEG)

A Figura 22 mostra as microfotografias obtidas no FEG da superfície tratada dos corpos de prova (CP) nos tempos de avaliação após 24 h de tratamento com os diferentes tratamentos. Ao realizar a análise descritiva pode-se observar que todos

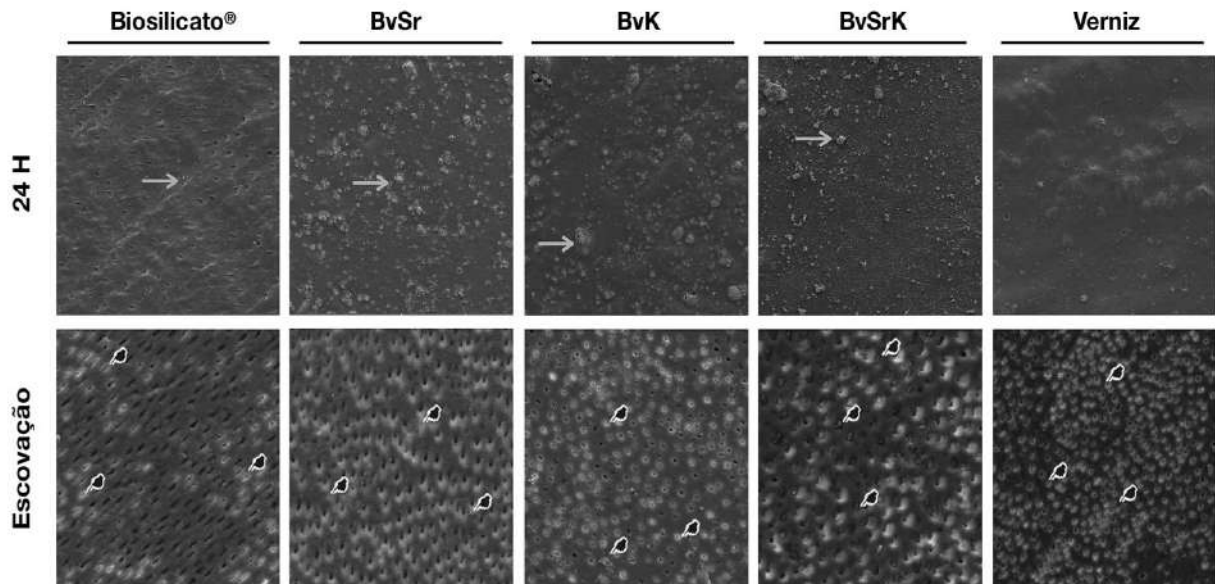


Figura 22. Microfotografias superficiais dos corpos de dentina bovina (CP) realizadas nos tempos de avaliação após 24 h e após escovação; as setas (→) indicam os locais onde é possível observar as partículas dos biovidros e a presença do verniz após 24 h de tratamento. (●) indica a presença dos biovidros na superfície e nos túbulos dentinários após escovação. Magnificação 1.5 kv. (Análise descritiva).

**Fonte:** A autora.

#### 7.2.5 Espectroscopia de energia dispersiva de raios X (EDS)

A Figura 23 mostra os resultados da análise da composição iônica obtida por meio espectroscopia de energia dispersiva de raios X, realizada na superfície dos CP após 24 H de tratamento, e a porcentagem dos elementos químicos presentes de cada um dos biovidros. Em todas as áreas analisadas dos CP tratados com algum dos biovidros foi possível identificar elementos químicos característicos dos materiais: Na, Si, P, Ca. Ao analisar os biovidros experimentais foi possível identificar e quantificar a presença dos elementos químicos estrôncio (Sr) e potássio (K) adicionados ao biovidros. Não foi detectada presença de outros elementos diferentes aos esperados.

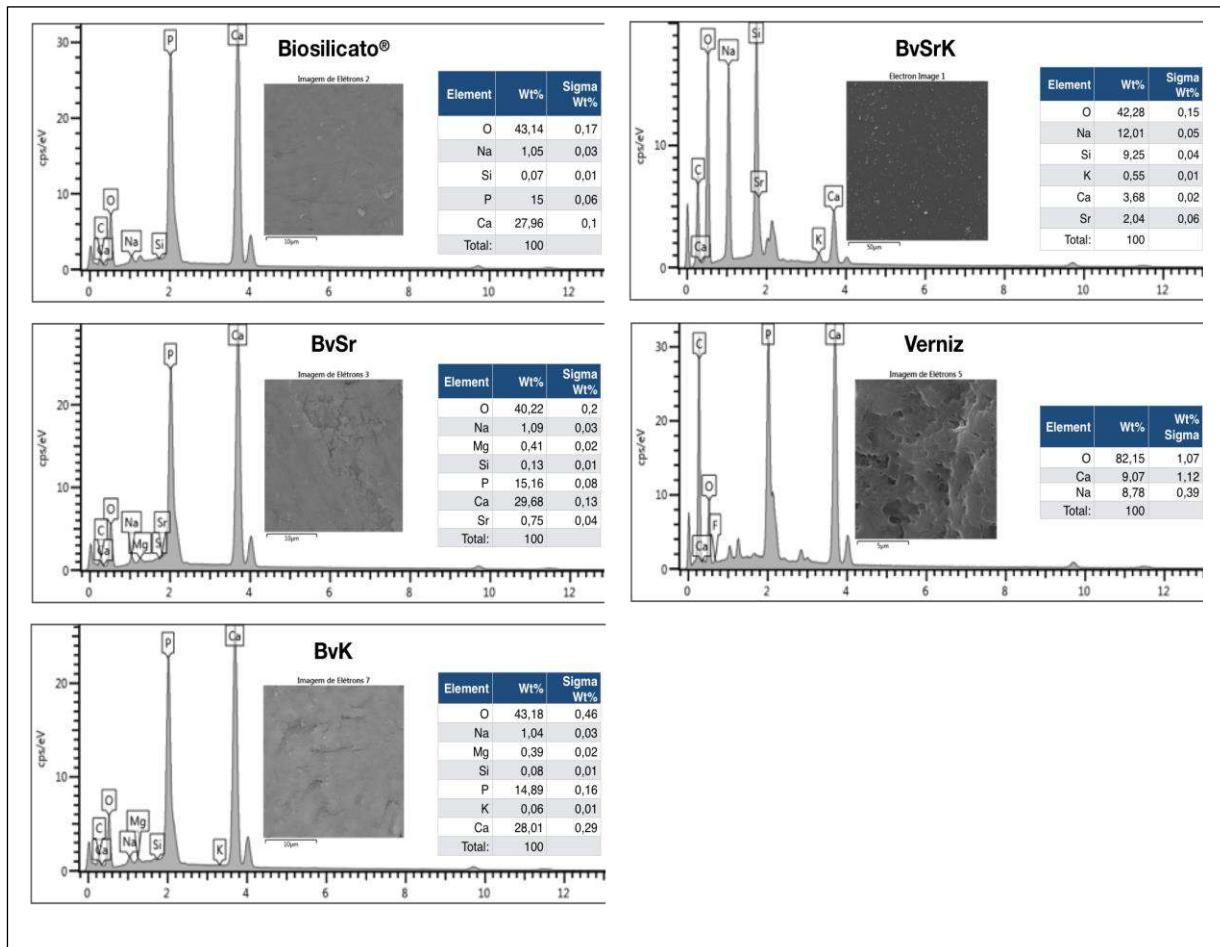


Figura 23. Análise da composição iônica da superfície dos corpos de prova de dentina bovina (CP) após 24 H aplicação dos diferentes tratamentos, obtida por espectroscopia de energia dispersiva de raios X (EDS).

Fonte: A autora.

### 7.3 EXPERIMENTO 3 (Capacidade de obliteração dos túbulos dentinários in vivo)

#### 7.3.1 Microscopia eletrônica de varredura por efeito de campo (FEG)

A Figura 24 mostra as microfotografias com aumento de 1800 vezes, realizadas na superfície radicular dos primeiros molares superiores esquerdos dos ratos que foram submetidos a cirurgia de indução de recessão gengival e posteriormente foram tratados com 7 vezes aplicações de acordo com o grupo que foi alocado. No grupo Naive se observa uma superfície regular sem exposição dos túbulos dentinários. No grupo EDTA pode-se observar a presença dos túbulos dentinários expostos na superfície, sendo aspecto irregular, diferente do observado no grupo Naive. O grupo Biosilicato<sup>®</sup> apresenta uma camada irregular sobre a dentina, com ausência de túbulos dentinários expostos na superfície. Nos grupos BvK, BvSr e Verniz se pode observar uma camada sobre a dentina um pouco mais regular e lisa em comparação como o Biosilicato<sup>®</sup> em que não se observou a presença de túbulos dentinários expostos em nenhuma das duas imagens.

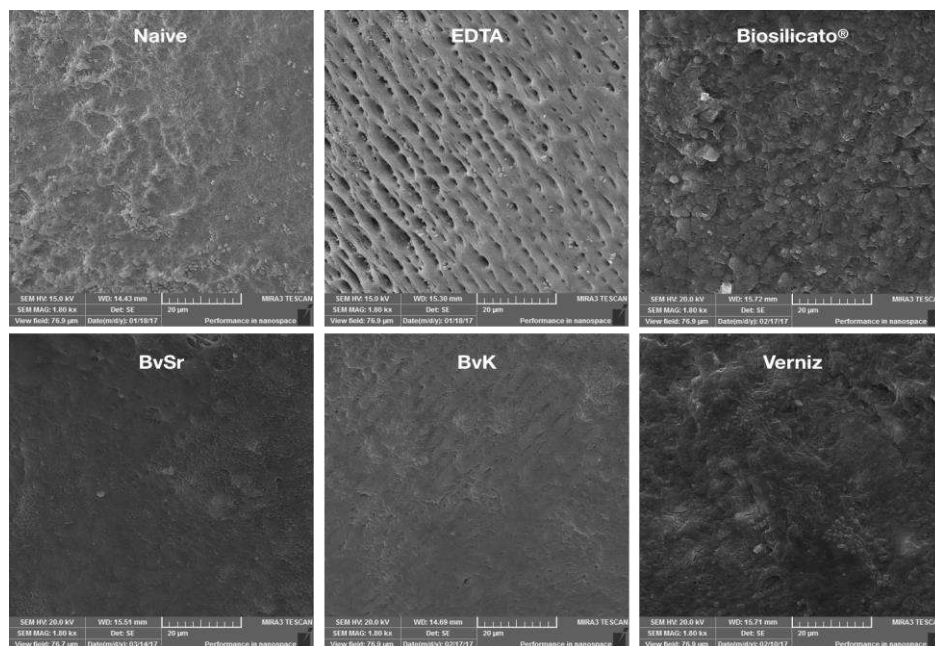


Figura 24 Microfotografias superficiais da cervical dos molares de rato (Naive) Grupo experimental controle (Naive) que não foi submetido a cirurgia; (EDTA) aplicação de EDTA para abertura dos túbulos nos animais submetidos a cirurgia de recessão gengival. (Biosilicato<sup>®</sup>) biovidro comercial; (BvK) biovidro experimental com adição de potássio; BvSr) biovidro experimental com adição de estrôncio e (Verniz) grupo controle do veículo usado. Magnificação 1800 vezes. (Análise descritiva).

**Fonte:** A autora.

A Figura 25 mostra as microfotografias com aumento de 10000 vezes, realizadas na superfície radicular dos molares dos ratos. Na microfotografia do grupo Naive se observou uma superfície irregular sem exposição dos túbulos dentinários. No grupo EDTA pode-se observar a presença dos túbulos dentinários expostos com superfície irregular. Nos grupos Biosilicato® e BvSr observou-se uma camada irregular sobre a dentina, sem túbulos dentinários. No grupo, BvK pode-se observar uma superfície irregular, com a presença de depósitos sugerindo partículas do biomaterial. No grupo Verniz não se observou a presença de túbulos dentinários expostos, mas foi observada a presença de estruturas como forma de bastão aderidas na superfície dentária sugerindo formas bacterianas.

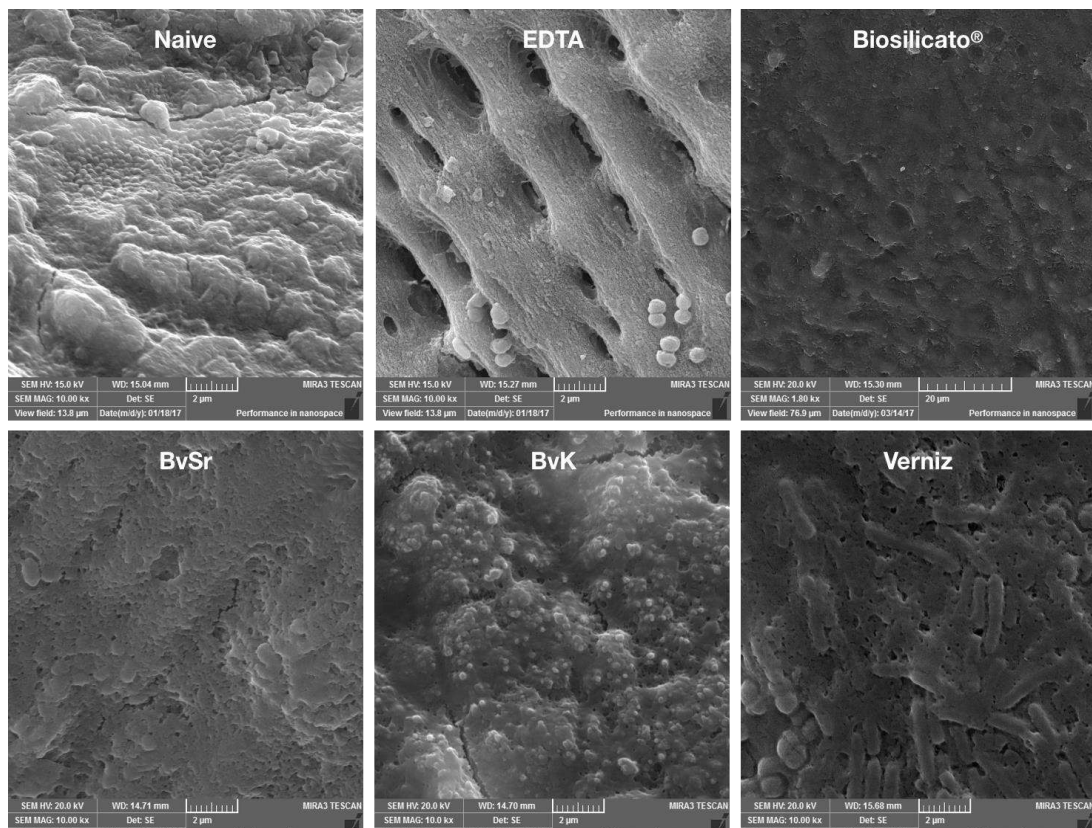


Figura 25. Microfotografias da superfície dos molares de rato na região cervical onde foi realizada a cirurgia de recessão gengival com os tratamentos realizados. (Naive) grupo experimental controle que não foi submetido a cirurgia de recessão gengival; (EDTA) aplicação de EDTA para abertura dos túbulos nos animais submetidos a cirurgia de recessão gengival. (Biosilicato®) biovidro comercial usado como controle positivo de tratamento; (Biovidro-K) biovidro experimental com adição de potássio; Biovidro-Sr) biovidro experimental com adição de estrôncio e (Verniz) grupo controle do veiculo usado. Magnificação 10000 kx. (Análise descritiva). Ajustar de acordo com a figura anterior.

**Fonte:** A autora.

### 7.3.2. Espectroscopia de energia dispersiva de raios X (EDS)

A figura 26 apresenta os resultados da espectroscopia de energia dispersiva de raios realizada na superfície radículas dos molares de rato, após eutanásia dos animais. Foi possível verificar a porcentagem dos elementos químicos presentes de cada um dos biovidros estudados. Foi possível identificar elementos químicos característicos dos materiais: Na, Si, P, Ca. Ao analisar os biovidros experimentais foi possível identificar e quantificar a presença dos elementos químicos estrôncio (Sr) e potássio (K) adicionados ao biovidros. Não foi detectada presença de outros elementos diferentes aos esperados.

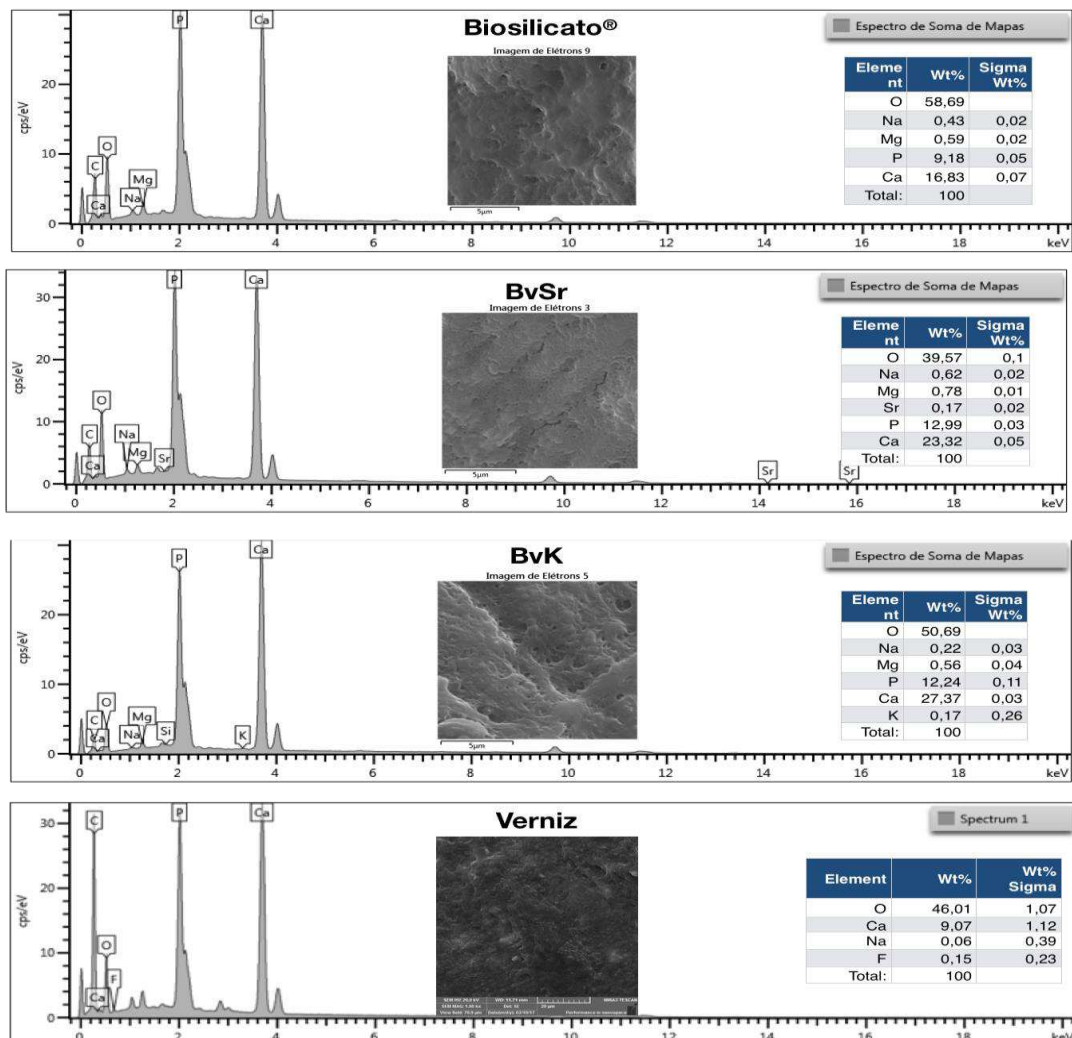


Figura 26. Análise da composição iônica da superfície dos molares de ratos após termino do período experimental e eutanásia dos animais aplicação dos diferentes tratamentos, obtida por espectroscopia de energia dispersiva de raios X (EDS).  
**Fonte:** A autora

## 8 DISCUSSÃO

O presente estudo analisou as propriedades biológicas (biocompatibilidade) e físicas (obliteração de túbulos dentinários) de formulações experimentais de biovidros contendo íons de Sr e K, como alternativa de tratamento da DH.

Nos ensaios de viabilidade celular (MTT e VN) foi possível observar que, no período de 24 horas de avaliação, nenhum material apresentou efeito citotóxico para as células NIH/3T3 nas concentrações de 5, 50, 100, 500 e 1000 µg/mL. Todos apresentaram um percentual de viabilidade de 70% ou maior em relação ao controle (DMEM). Esse é um resultado positivo, considerando o estabelecido na norma ISO 10993-5 (2009), na qual é especificado que um material é citotóxico se tiver um valor inferior a 70% em comparação com o controle. No período de 48 horas no ensaio MTT, observou-se que todos os biovidros produziram um aumento na viabilidade celular, porém o grupo Bs obteve os valores mais altos sendo estatisticamente significativo quando comparado com o DMEM até a concentração de 500 µg/mL, contudo só nas concentrações de 5 e 50µg/mL foi estatisticamente diferente aos grupos experimentais. Esses resultados são similares com os observados no estudo de Silver et al., eles avaliaram o efeito do Bioglass® 45S5 em osteoblastos, eles observaram que a dissolução de íons de cálcio e sílica a partir do biovidro, estimulou a divisão celular dos osteoblastos, a produção de fatores de crescimento e as proteínas da matriz extracelular colágena (Silver et al. <sup>52</sup> 2001).

O ensaio de VN no período de 48h, apresentou resultados similares aos obtidos no ensaio MTT, com uma viabilidade não inferior a 70% que se manteve até a concentração de 1000 µg/mL. Apesar disso, uma viabilidade maior que o controle não foi evidenciada. As diferenças observadas entre os dois ensaios podem ser explicadas pela diferença entre eles. Em geral, os dois ensaios avaliam o mesmo, sendo que o resultado é proporcional ao número de células viáveis (nas condições de linearidade do ensaio). No entanto, ambos os ensaios utilizam uma abordagem diferente: o MTT se baseia na redução do reagente amarelo tetrazólio de MTTa formazan roxo na mitocôndria de células viáveis (Kumar et al. <sup>53</sup> 2018). Enquanto o ensaio VN baseia-se na capacidade das células viáveis de absorver o corante vermelho neutro e armazená-lo nos lisossomos. Este corante fracamente catiônico penetra nas membranas celulares por difusão passiva não iônica em presença de um pH fisiológico (Repetto et al. <sup>54</sup> 2008). Mas a literatura reporta que o biovidro em

meio aquoso apresenta uma solubilidade de íons como o Ca e Na, esses íons aumentam o pH neutro a básico com valores entre 7,5 e 8 (Hoppe et al. <sup>55</sup> 2011). Em presença do pH básico a entrada do corante poderia ser menor e conseqüentemente haveria uma redução nos valores de absorvância ao fazer a leitura final no espectrofotômetro, isto seria interpretado como uma viabilidade celular inferior (Soares et al. <sup>56</sup> 2016). Isso poderia explicar porque os resultados do ensaio VN foram menores comparado com os obtidos no ensaio MTT

As mudanças morfológicas observadas são compatíveis com as alterações morfológicas características do apoptose que no núcleo são a condensação da cromatina e a fragmentação nuclear enquanto que no citoplasma inicia um desmonte organizado da célula com a membrana plasmática intacta durante o processo todo. Já a necrose celular ocorre de uma forma desorganizada como foi observado no grupo DMSO e citrato (controles de toxicidade). Contudo, nenhum dos biovidros provocou as alterações observadas no grupo DMSO e no citrato, pode-se interpretar que o biovidro em concentrações de 5000 µg/mL pode induzir a apoptose de algumas células, mas não a necrose. Porém, estudos com metodologias mais especializadas como a citometria de fluxo oferecia respostas mais específicas ao respeito do tipo de morte celular provocada pelos materiais, além da medição das características das células, que pode incluir o tamanho da célula, a contagem de células e o ciclo celular (Errante <sup>50</sup> 2016; Bairo et al. <sup>57</sup> 2018)

As pesquisas realizadas em osteoblastos humanos primários mostram que há controle genético da resposta celular em até 48 horas após a exposição aos produtos de dissolução iônica dos vidros bioativos como: os fatores de transcrição e reguladores do ciclo celular; moléculas de transdução de sinal; proteínas envolvidas na síntese, reparo e recombinação do DNA e fatores de crescimento (Hench e Polak <sup>58</sup> 2002; Bosetti ; Cannas <sup>59</sup> 2005). Os osteoblastos com o vidros bioativos produzem matriz extracelular de colágeno que mineraliza para formar nódulos ósseos sem os suplementos usuais de hormônios presentes na cultura, mesmo quando o fosfato não estava na composição, é por isso que se associa esse efeito à dissolução de íons de Ca e Si além de estimular a divisão celular (Xynos et al. <sup>60</sup> 2001). Nestas mesmas células observou-se que a expressão do fator de crescimento semelhante à insulina II (IGF-II), e que induz a proliferação dos osteoblastos, aumentou mais de 3 vezes em presença do biovidro (Hoppe et al. <sup>55</sup> 2011; Xynos et al. <sup>61</sup> 2000; Hench <sup>62</sup> 2009). Conhecer o papel individual dos



produtos de dissolução dos biovidros, é importante para compreender seu comportamento *in vitro* e *in vivo*, assim como para o desenvolvimento de novos materiais.

Os biovidros experimentais BvSr e BvK apresentaram valores maiores de viabilidade celular quando comparado com o BvSrK, isso pode-se associar às mudanças realizadas nas porcentagens da formulação para incluir os Sr, K e SrK. A literatura relata que o estrôncio pode potencialmente substituir o cálcio na matriz do biovidro. No estudo realizado por Gentleman et al (2010), eles avaliaram os efeitos dos vidros bioativos substituídos por estrôncio sobre osteoblastos e osteoclastos *in vitro*, e encontraram que a adição de estrôncio aumenta a proliferação de osteoblastos e inibe a reabsorção mediada por osteoclastos. Estudos similares concluem que pode ser um material eficaz na regeneração óssea e é um potencial material para o tratamento em pessoas com osteoporose (Hoppe et al. <sup>55</sup> 2011; Gentleman et al. <sup>63</sup> 2010; Marie et al. <sup>64</sup> 2001; Marie <sup>65</sup> 2006). Esses resultados são semelhantes aos de um estudo no qual eles adicionaram 0,1wt% de SrCO<sub>3</sub> na matriz de um biovidro, e eles consideraram que o Sr induziu um aumento de 14,3% na proliferação celular(Oudadesse et al. <sup>66</sup> 2011).

A adição do óxido de potássio substituindo o óxido de sódio na composição do Bioglass 45S5®, mostrou uma tendência reduzida a cristalizar em relação ao Bioglass® (Zreiqat et al. <sup>37</sup> 2010; Bellucci et al. <sup>67</sup> 2011; Bellucci et al. <sup>68</sup> 2011). E a presença de uma alta quantidade de CaO na nova composição desacelera a troca iônica e a dissolução dos íons evitando assim o rápido aumento no pH da solução; embora os osteoblastos prefiram um meio levemente alcalino (Ramp et al. <sup>69</sup> 1994). O valor do pH permaneceu entre 7,5 e 8 durante todo o processo, mas alterações graves no pH podem causar necrose celular (el-Ghannam et al. <sup>70</sup> 1997). No estudo de Kalmodia e Molla (2010), um dos resultados importantes é que o componente de boro e flúor na cerâmica de vidro tem influência significativa na citocompatibilidade, adesão celular e propriedades de fixação celular. Independentemente da linha celular (L929 e Saos-2), a propagação celular, extensão citoplasmática, é observada em toda a cerâmica de vidro investigada qualitativamente em extensão semelhante (Kalmodia et al. <sup>71</sup> 2010).

o Bs apresentou um excelente comportamento tanto na cultura celular especialmente em células de linhagem como as NIH/3T3 onde foi observado um aumento nos valores de absorvância que são interpretados como uma maior

proliferação celular, esses resultados coincidem com os reportados na literatura. Nas CIPH não provocou alterações morfológicas. As pesquisas mostram que Bs é biocompatível, apresenta potencial osteogênico e angiogênico e pode acelerar o processo de cicatrização óssea.(Renno et al. <sup>72</sup> 2013)

Na avaliação das propriedades físicas do material optou-se por usar dentes bovinos devido as semelhanças com os dentes humanos e pela facilidade de obter um número grande de espécimes (Soares et al. <sup>56</sup> 2016; Yassen et al. <sup>73</sup> 2011). Todas as amostras foram tratadas com EDTA para simular uma superfície dentinária similar à afetada por HD, mais permeável, menor microdureza e uma superfície irregular associada a um maior numero de túbulos expostos e de maior diâmetro (Clark-Holke et al. <sup>74</sup> 2003). Quando a densidade tubular aumentou foi associado a uma diminuição na microdureza da dentina, provavelmente devido a uma diminuição na quantidade de dentina intertubular e um aumento no diâmetro tubular individual(Pashley et al. <sup>75</sup> 1985). Os estudos que reportam que o EDTA aumenta a energia superficial da dentina o que é associado a uma maior facilidade de penetração dos diferentes materiais aplicados sobre a dentina (Almeida et al. <sup>76</sup> 2015).

No teste de microdureza Vickers após aplicação de EDTA todos os CP apresentaram redução nos valores de MD com respeito ao valor inicial, o mesmo aumentou após 24 h de aplicação do tratamento com os biovidros, o que mostra que houve deposito dos biovidros na superfície. A microdureza da dentina depende da quantidade de matriz calcificada por milímetro quadrado e sua determinação fornece evidências indiretas de perda ou ganho mineral nos tecidos dentários (Unnikrishnan et al. <sup>77</sup> 2019). Após escovação artificial só o grupo BvSr manteve o efeito, mas os demais tratamentos conseguiram recuperar a MD inicial do CP antes da aplicação do EDTA. Esse resultado é similar ao observado o estudo de Wang et al (2019), eles avaliaram o efeito do Sr no esmalte, eles concluíram que íon estrôncio pode diminuir a dissolução do esmalte e evitar a perda de dureza da superfície do esmalte em ambiente ácido, os íons de Sr podem formar a camada que por sua vez, reduz o potencial erosivo da solução ácida e alcança o efeito protetor no esmalte. (Wang et al. <sup>78</sup> 2019). O trabalho de Saffarpour et al, avaliaram formulações de biovidro contendo Sr contendo, e observaram que possui alto potencial de remineralização, pois o Sr estabiliza a rede de apatita e exibe resistência à dissolução (Saffarpour et al. <sup>79</sup> 2017; Santos Cardoso et al. <sup>80</sup> 2018). Os nossos resultados mostram que os

biovidros (experimentais e controle) conseguiram recuperar a microdureza inicial que para nosso estúdio representa dentina sem DH, podendo ser interpretado o efeito de remineralização da superfície dentinária pelos materiais.

No teste de rugosidade superficial, observamos que a aplicação EDTA conseguiu uma rugosidade similar em todos os CP. Após 24h de aplicação dos tratamentos a RS aumento significativamente com respeito ao valor inicial e após EDTA. Quando foi realizada a escovação artificial a rugosidade obtida se manteve próximo dos valores obtidos no tempo de avaliação de 24 h. Os resultados conseguiram demonstrar que os tratamentos se mantiveram na superfície dentinária após o desafio da escovação, e esse resultado confirma o que foi observado no teste de microdureza. Embora o grupo Bs teve os valores mais altos, ele não apresentou uma diferença estatisticamente significativa com os grupos BvSr, BvK e BvSrK. Um resultado similar foi observado no estudo de Wang et al., (2011), os valores de rugosidade após o polimento da superfície da dentina foram significativamente menores do que aqueles após os tratamentos, concluíram que os dois vidros bioativos possuíam alta capacidade de remineralização (Wang et al. <sup>81</sup> 2011). No estudo realizado por Sheng et al (2016) observaram que o tratamento com diferentes biovidros promoveu a formação de minerais nas superfícies e nos túbulos da dentina e exibiram maior estabilidade e resistência a ácidos. O pode ser considerado um material potencial para o tratamento da hipersensibilidade à dentina e a promoção da mineralização da dentina (Sheng et al. <sup>82</sup> 2016).

Ao comparar a permeabilidade dentinária inicial (dentina sem tratar) com a permeabilidade da dentina tratada com EDTA, o valor da PD aumento significativamente. Após 24h de aplicação do tratamento todos os tratamentos conseguiram reduzir a PD porem os CP tratados com o BvSrK os que apresentaram a permeabilidade mais reduzida; e manteve esse efeito após escovação, o que poderia ser explicado de duas maneiras: um número menor de túbulos expostos na superfície (oclusão) e / ou um diâmetro menor dos túbulos Ensaio in vitro mostraram que as partículas do Bioglass 45S5 parecem aderir à dentina (Bohner e Lemaitre <sup>83</sup> 2009). Isso pode explicar como as partículas estimulam o reparo a longo prazo, embora a escovação possa durar apenas alguns minutos por dia. Foi realizado um estudo clínico comparativo para avaliar o biosilicato (partículas de 1 a 20 $\mu$ m) para tratar a hipersensibilidade dentinária (DH). Os autores mostraram que o biosilicato é mais eficiente no tratamento da DH em comparação às pastas dentárias

comercialmente disponíveis oferecendo um tratamento mais rápido no alívio da dor (Tirapelli et al. <sup>84</sup> 2011). Estudos clínicos mostram que as partículas do Bioglass 45S5 aderem à dentina e formam uma camada de HCA que é semelhante em composição ao esmalte dos dentes e bloqueia os túbulos, com  $\pm 1 \mu\text{m}$  de diâmetro, aliviando a dor por períodos mais longos (Kokubo e Takadama <sup>85</sup> 2006). Os testes também mostraram que os túbulos permaneceram ocluídos após 24 horas e após a lavagem com cola, suco, café e outras escovas, o que foi atribuído às partículas de vidro ligadas à dentina.

NovaMin imediatamente após ser escovado na dentina. As partículas aderem e, em 24 horas, a superfície estava quase completamente coberta por uma camada de HCA. Isso indica que o NovaMin parece funcionar estimulando a mineralização (deposição de fosfato de cálcio sobre os túbulos dentinários). É provável que os produtos de dissolução de vidro estimulem a mineralização. A deposição de HCA é promovida por um aumento de pH e a dissolução do vidro na boca também causaria um aumento de pH. A saliva contém naturalmente inibidores de mineralização; portanto, uma explosão de cálcio e fosfato no viscosidade e um aumento do pH podem melhorar a mineralização.

Os CP confeccionados em dentina bovina foram levados ao FEG para obtenção de imagens da sua superfície e foi realizado conjuntamente a análise de EDS que permitiu conhecer a composição química dessa superfície. Foi possível encontrar nos CP que houve uma oclusão dos túbulos dentinários quando 24 h após aplicação do tratamento em todos os grupos, mas após escovação os grupos BvSrK e Bs foram os que conseguiram manter uma maior quantidade de túbulos obliterados ou parcialmente obliterados comparados com BvSr, BvK e o verniz. Esses achados coincidem com o reportado na literatura, onde as imagens de microscopia eletrônica de varredura realizada em dentina após aplicação de gel de Bs + flúor após 24 horas tendeu a produzir amostras com uma camada mais homogênea cobrindo a abertura dos túbulos dentinários (Pinheiro et al. <sup>86</sup> 2013; Jones <sup>87</sup> 2015). No estudo de creme dental contendo partículas de Bioglass® 45S5 NovaMin, se observou que imediatamente após ser escovado na dentina, as partículas aderem-se à superfície em 24 horas; a superfície estava quase completamente coberta por uma camada de hidroxycarbonato de apatita. Isso indica que o NovaMin parece funcionar estimulando a mineralização (deposição de fosfato de cálcio sobre os túbulos dentinários) (Huang et al. <sup>88</sup> 2018). Neste estudo foi

usado o Biosilicate® como controle para os nossos biovidros experimentais para o tratamento da DH. O biosilicato foi desenvolvido pela primeira vez em pó para o tratamento da hipersensibilidade à dentina (Tirapelli et al. <sup>39</sup> 2010). Quando em contato com a dentina, as partículas de biosilicato reagem rapidamente com o tecido circundante dentro dos microcanais da dentina, eliminando a hipersensibilidade dentária promovendo sua oclusão (Tirapelli et al. <sup>39</sup> 2010; Hoppe et al. <sup>55</sup> 2011). No entanto, sendo o Bs um ótimo material, os biovidros experimentais conseguiram ter resultados similares e em alguns testes como a permeabilidade obtiveram resultados superiores como o BvSrK.

Os espécimes do primeiro molar superior dos ratos obtidos após realizado o protocolo de aplicação dos materiais in vivo. Foram realizadas as microfotografias no FEG e a análise composicional no EDS. Foi possível corroborar que a aplicação de EDTA deixava uma superfície com os túbulos expostos e que nos mesmos comparado ao Naive. Nos grupos que receberam tratamento foi possível observar a formação de uma camada na superfície radicular ocluindo os túbulos dentinários tanto os que foram tratados com os biovidros como o tratado com o verniz, no entanto no grupo verniz se observou formas de bastões na superfície, o que pode ser compatível com crescimento bacteriano. Esse pode ser explicado pelo efeito antibacteriano que tem os biovidros, favorecendo uma diminuição no depósito bacteriano sobre a superfície dental. No EDS foi possível corroborar a presença dos íons Ca, Na, P em todas as amostras isto porque são componentes da dentina e também dos biovidros, e os íons Sr e K em suas respectivas amostras, o que confirma que o tratamento se manteve após as aplicações, o íon Si não foi detectado isto pode estar associado a sua rápida dissolução porém é uma teoria que deve ser estudada para analisar como ocorre essa liberação de íons do biovidro quando aplicado em cavidade bucal, com a presença da saliva, o desafio dos ácidos e os alimentos e as bactérias presentes. Como a metodologia usada para este experimento faz parte de uma proposta de modelo de DH in vivo, não se encontraram estudos para realizar uma comparação. Com tudo, o resultado é interessante pois no modelo conseguimos ter elementos que não são fáceis de simular em um estudo in vitro como é a ação da língua e dos alimentos sobre a superfície radicular tratada.

Os resultados deste trabalho permitiram observar que as características biológicas e físicas dos biovidros experimentais contendo Sr e K, são similares às

descritas na literatura desde a criação do Bioglas® 45S5 e todas as formulações criadas a partir de dessa fórmula criada por Larry Hench. Porém novas pesquisas precisam ser realizadas, incluindo metodologias especializadas que permitam uma melhor compreensão do comportamento desses materiais e o efeito dos íons nas proporções utilizadas nas formulações experimentais. Avaliar a capacidade de ligação entre os minerais recém-formados e o colágeno, juntamente com as propriedades mecânicas da dentina mineralizada. Finalmente realizar ensaios clínicos randomizados que permitam avaliar o efeito dos biovidros no alívio da DH em pacientes e conseguir assim realizar uma correlação com os resultados obtidos.

## CONCLUSÕES

O presente estudo permitiu mostrar a possibilidade de usar biovidros contendo estrôncio e potássio como tratamento alternativo para a HD. Os testes biológicos mostraram a segurança de biovidros contendo estrôncio e potássio aplicados na cultura celular (CIHP - NIH3T3), observou-se um estímulo na proliferação celular, conservação das características morfológicas e integridade da membrana celular, em concentrações de até 500 ug / ml.

Na avaliação das propriedades físicas dos biovidros aplicados nos CP da dentina bovina, foi possível verificar o depósito dos tratamentos na superfície pelo aumento da rugosidade dos CP, apresentando também aumento nos valores micro dureza do CP e reduzir a condutividade hidráulica da dentina.

O modelo de recessão gengival em molares de rato, foi eficiente em expor a superfície radicular do molar e a análise FEG e EDS permitiu observar o depósito dos diferentes biovidros na superfície dentinária.

## REFERÊNCIAS

1. Holland GR, Narhi MN, Addy M, Gangarosa L, Orchardson R. Guidelines for the design and conduct of clinical trials on dentine hypersensitivity. *Journal of clinical periodontology*. 1997; Nov;24(11):808-13.
2. Cunha-Cruz J, Wataha JC, Heaton LJ, Rothen M, Sobieraj M, Scott J, et al. The prevalence of dentin hypersensitivity in general dental practices in the northwest United States. *Journal of the American Dental Association (1939)*. 2013; Mar;144(3):288-96.
3. Rees JS, Addy M. A cross-sectional study of buccal cervical sensitivity in UK general dental practice and a summary review of prevalence studies. *International journal of dental hygiene*. 2004; May;2(2):64-9.
4. Rees J, Addy M. A cross-sectional study of dentine hypersensitivity. *Journal of clinical periodontology*. 2002;29(11):997-1003.
5. Alcantara PM, Barroso NFF, Botelho AM, Douglas-de-Oliveira DW, Goncalves PF, Flecha OD. Associated factors to cervical dentin hypersensitivity in adults: a transversal study. *BMC Oral Health*. 2018; Sep 3;18(1):155.
6. Gillam DG, Seo HS, Bulman JS, Newman HN. Perceptions of dentine hypersensitivity in a general practice population. *Journal of oral rehabilitation*. 1999; Sep;26(9):710-4.
7. Gibson B, Boiko O, Baker S, Robinson P, Barlow A, Player T, et al. The everyday impact of dentine sensitivity: personal and functional aspects. *Social Science and Dentistry*. 2010;1(1):11-20.
8. Addy M, Hunter ML. Can tooth brushing damage your health? Effects on oral and dental tissues. *International dental journal*. 2003;53 Suppl 3:177-86.
9. Liu HC, Lan WH, Hsieh CC. Prevalence and distribution of cervical dentin hypersensitivity in a population in Taipei, Taiwan. *J Endod*. 1998; Jan;24(1):45-7.
10. Ishikawa K, Suge T, Yoshiyama M, Kawasaki A, Asaoka K, Ebisu S. Occlusion of dentinal tubules with calcium phosphate using acidic calcium phosphate solution followed by neutralization. *Journal of dental research*. 1994;73(6):1197-204.
11. Pashley DH. Dentin-predentin complex and its permeability: physiologic overview. *J Dent Res*. 1985; Apr;64 Spec No:613-20.
12. Absi E, Addy M, Adams D. Dentine hypersensitivity. *Journal of clinical periodontology*. 1987;14(5):280-4.



13. Maurin JC, Couble ML, Thivichon-Prince B, Magloire H. [Odontoblast: a key cell involved in the perception of dentinal pain]. *Medecine sciences : M/S*. 2013; Mar;29(3):293-9.
14. Tokuda M, Tatsuyama S, Fujisawa M, Morimoto-Yamashita Y, Kawakami Y, Shibukawa Y, et al. Dentin and pulp sense cold stimulus. *Medical hypotheses*. 2015; May;84(5):442-4.
15. Brännström M. Dentin sensitivity and aspiration of odontoblasts. *The Journal of the American Dental Association*. 1963;66(3):366-70.
16. Orchardson R, Gillam DG. Managing dentin hypersensitivity. *Journal of the American Dental Association (1939)*. 2006; Jul;137(7):990-8; quiz 1028-9.
17. Prati C. What is the clinical relevance of in vitro dentine permeability tests? *Journal of dentistry*. 1994;22(2):83-8.
18. Pashley DH. Dentine permeability and its role in the pathobiology of dentine sensitivity. *Archives of Oral Biology*. 1994;39:S73-S80.
19. Tarbet WJ, Silverman G, Fratarcangelo PA, Kanapka JA. Home treatment for dentinal hypersensitivity: a comparative study. *Journal of the American Dental Association (1939)*. 1982; Aug;105(2):227-30.
20. Frechoso SC, Menendez M, Guisasola C, Arregui I, Tejerina JM, Sicilia A. Evaluation of the efficacy of two potassium nitrate bioadhesive gels (5% and 10%) in the treatment of dentine hypersensitivity. A randomised clinical trial. *Journal of clinical periodontology*. 2003; Apr;30(4):315-20.
21. Topbasi B, Turkmen C, Gunday M. An investigation of the effect of a desensitizing dentifrice on dentinal tubules in vitro and in vivo. *Quintessence international (Berlin, Germany : 1985)*. 1998; Mar;29(3):197-9.
22. Kishore A, Mehrotra KK, Saimbi CS. Effectiveness of desensitizing agents. *Journal of endodontics*. 2002;28(1):34-5.
23. Nagata T, Ishida H, Shinohara H, Nishikawa S, Kasahara S, Wakano Y, et al. Clinical evaluation of a potassium nitrate dentifrice for the treatment of dentinal hypersensitivity. *Journal of clinical periodontology*. 1994;21(3):217-21.
24. Trowbridge HO, Silver D. A review of current approaches to in-office management of tooth hypersensitivity. *Dental Clinics of North America*. 1990;34(3):561-81.
25. Schwarz F, Arweiler N, Georg T, Reich E. Desensitizing effects of an Er: YAG laser on hypersensitive dentine: a controlled, prospective clinical study. *Journal of clinical periodontology*. 2002;29(3):211-5.

26. Suge T, Ishikawa K, Kawasaki A, Yoshiyama M, Asaoka K, Ebisu S. Duration of dentinal tubule occlusion formed by calcium phosphate precipitation method: in vitro evaluation using synthetic saliva. *Journal of dental research*. 1995;74(10):1709-14.
27. Hench L, Paschall H. Histochemical responses at a biomaterial's interface. *Journal of biomedical materials research*. 1974;8(3):49-64.
28. Kokubo T, Kim H-M, Kawashita M. Novel bioactive materials with different mechanical properties. *Biomaterials*. 2003;24(13):2161-75.
29. Chang C. Study on the treatment of dentin hypersensitivity by a bioactive glass. *Formo J Med*. 2003;7:42-7.
30. Lee B-S, Tsai H-Y, Tsai Y-L, Lan W-H, Lin C-P. In vitro study of DP-bioglass paste for treatment of dentin hypersensitivity. *Dental materials journal*. 2005;24(4):562-9.
31. Kuo T-C, Lee B-S, Kang S-H, Lin F-H, Lin C-P. Cytotoxicity of DP-bioglass paste used for treatment of dentin hypersensitivity. *Journal of endodontics*. 2007;33(4):451-4.
32. Wang Z, Sa Y, Sauro S, Chen H, Xing W, Ma X, et al. Effect of desensitising toothpastes on dentinal tubule occlusion: a dentine permeability measurement and SEM in vitro study. *Journal of dentistry*. 2010; May;38(5):400-10.
33. Otto DP, de Villiers MM. Physicochemical principles of nanosized drug delivery systems. *Nanotechnology in drug delivery*: Springer; 2009. p. 3-33.
34. Chiang Y-C, Chen H-J, Liu H-C, Kang S-H, Lee B-S, Lin F-H, et al. A novel mesoporous biomaterial for treating dentin hypersensitivity. *Journal of dental research*. 2010;89(3):236-40.
35. Murphy S, Wren A, Towler M, Boyd D. The effect of ionic dissolution products of Ca–Sr–Na–Zn–Si bioactive glass on in vitro cytocompatibility. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2010;21(10):2827-34.
36. Montazerian M, Yekta BE, Marghussian VK, Bellani CF, Siqueira RL, Zanotto ED. Bioactivity and cell proliferation in radiopaque gel-derived CaO-P2O5-SiO2-ZrO2 glass and glass-ceramic powders. *Materials science & engineering C, Materials for biological applications*. 2015; Oct;55:436-47.
37. Zreiqat H, Ramaswamy Y, Wu C, Paschalidis A, Lu Z, James B, et al. The incorporation of strontium and zinc into a calcium–silicon ceramic for bone tissue engineering. *Biomaterials*. 2010;31(12):3175-84.

38. Winston A, Charig A, Thong S. Mechanism of action of a desensitizing fluoride toothpaste delivering calcium and phosphate ingredients in the treatment of dental hypersensitivity. Part III: Prevention of dye penetration through dentin vs a calcium- and phosphate-free control. *Compendium of continuing education in dentistry* (Jamesburg, NJ: 1995). 2010;31(1):46-8, 50-2.
39. Tirapelli C, Panzeri H, Soares RG, Peitl O, Zanotto ED. A novel bioactive glass-ceramic for treating dentin hypersensitivity. *Brazilian Oral Research*. 2010;24:381-7.
40. Markowitz K. The original desensitizers: Strontium and potassium salts. *The Journal of clinical dentistry*. 2009;20(5):145-51.
41. Bartold PM. Dentinal hypersensitivity: a review. *Australian dental journal*. 2006; Sep;51(3):212-8; quiz 76.
42. Alegria-Acevedo LF. Caracterização e avaliação in vitro de biovidro experimental em micropartículas para o tratamento da hipersensibilidade dentinária cervical: Universidade Estadual de Ponta Grossa; 2016.
43. ISO. International Organization for Standardization 10993-5:2009 Biological evaluation of medical devices -- Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity. 2009:1-34.
44. Huang GT, Sonoyama W, Chen J, Park SH. In vitro characterization of human dental pulp cells: various isolation methods and culturing environments. *Cell and tissue research*. 2006; May;324(2):225-36.
45. Huller D. Caracterização e avaliação do potencial citotóxico, antimicrobiano e anti-inflamatório de nanopartículas de ouro Universidade Estadual de Ponta Grossa; 2018.
46. Tanaka JLO, Medici Filho E, Salgado JAP, Salgado MAC, Moraes LCd, Moraes MELd, et al. Comparative analysis of human and bovine teeth: radiographic density. *Brazilian oral research*. 2008;22(4):346-51.
47. Reis AF, Giannini M, Kavaguchi A, Soares CJ, Line SR. Comparison of microtensile bond strength to enamel and dentin of human, bovine, and porcine teeth. *Journal of Adhesive Dentistry*. 2004.
48. Camargo CH, Siviero M, Camargo SEA, de Oliveira SH, Carvalho CA, Valera MC. Topographical, diametral, and quantitative analysis of dentin tubules in the root canals of human and bovine teeth. *Journal of endodontics*. 2007;33(4):422-6.
49. Reinke SM, Rastelli MC, Santos FA, Wambier D. Ação de escovas dentais de diferentes texturas em cimentos de ionômero de vidro indicados para o tratamento restaurador atraumático. *Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada*. 2011;11(2).

50. Errante P. Flow cytometry: a literature review 2016.
51. Dalmolin AC. Avaliação histológica e imuno-histoquímica do complexo dentino-pulpar em modelo de recessão gengival com diferentes formulações de biovidros nanoparticulados para obliteração de túbulos dentinários- estudo em ratos: Universidade Estadual de Ponta Grossa; 2018.
52. Silver IA, Deas J, Erecinska M. Interactions of bioactive glasses with osteoblasts in vitro: effects of 45S5 Bioglass, and 58S and 77S bioactive glasses on metabolism, intracellular ion concentrations and cell viability. *Biomaterials*. 2001; Jan;22(2):175-85.
53. Kumar P, Nagarajan A, Uchil PD. Analysis of Cell Viability by the MTT Assay. *Cold Spring Harb Protoc*. 2018;2018(6):10.1101/pdb.prot095505.
54. Repetto G, del Peso A, Zurita JL. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nat Protoc*. 2008;3(7):1125-31.
55. Hoppe A, Güldal NS, Boccaccini AR. A review of the biological response to ionic dissolution products from bioactive glasses and glass-ceramics. *Biomaterials*. 2011;32(11):2757-74.
56. Soares FZM, Follak A, da Rosa LS, Montagner AF, Lenzi TL, Rocha RO. Bovine tooth is a substitute for human tooth on bond strength studies: A systematic review and meta-analysis of in vitro studies. *Dent Mater*. 2016;32(11):1385-93.
57. Baino F, Hamzehlou S, Kargozar S. Bioactive Glasses: Where Are We and Where Are We Going? *Journal of Functional Biomaterials*. 2018; 03/19;9:25.
58. Hench LL, Polak JM. Third-Generation Biomedical Materials. *Science*. 2002;295(5557):1014.
59. Bosetti M, Cannas M. The effect of bioactive glasses on bone marrow stromal cells differentiation. *Biomaterials*. 2005;26(18):3873-9.
60. Xynos ID, Edgar AJ, Buttery LD, Hench LL, Polak JM. Gene-expression profiling of human osteoblasts following treatment with the ionic products of Bioglass 45S5 dissolution. *Journal of biomedical materials research*. 2001;55(2):151-7.
61. Xynos ID, Edgar AJ, Buttery LD, Hench LL, Polak JM. Ionic products of bioactive glass dissolution increase proliferation of human osteoblasts and induce insulin-like growth factor II mRNA expression and protein synthesis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000;276(2):461-5.
62. Hench LL. Genetic design of bioactive glass. *Journal of the European Ceramic Society*. 2009; 2009/04/01;29(7):1257-65.

63. Gentleman E, Fredholm YC, Jell G, Lotfibakhshaiesh N, O'Donnell MD, Hill RG, et al. The effects of strontium-substituted bioactive glasses on osteoblasts and osteoclasts in vitro. *Biomaterials*. 2010;31(14):3949-56.
64. Marie PJ, Ammann P, Boivin G, Rey C. Mechanisms of action and therapeutic potential of strontium in bone. *Calcif Tissue Int*. 2001;69(3):121-9.
65. Marie PJ. Strontium ranelate: a physiological approach for optimizing bone formation and resorption. *Bone*. 2006;38(2 Suppl 1):S10-S4.
66. Oudadesse H, Dietrich E, Bui XV, Le Gal Y, Pellen P, Cathelineau G. Enhancement of cells proliferation and control of bioactivity of strontium doped glass. *Applied Surface Science*. 2011; 2011/08/01/;257(20):8587-93.
67. Bellucci D, Cannillo V, Sola A. Calcium and potassium addition to facilitate the sintering of bioactive glasses. *Materials Letters*. 2011; 2011/06/30/;65(12):1825-7.
68. Bellucci D, Cannillo V, Sola A. A New Potassium-Based Bioactive Glass: Sintering Behaviour and Possible Applications for Bioceramic Scaffolds. *Ceramics International*. 2011; 01/31;37:145-57.
69. Ramp WK, Lenz LG, Kaysinger KK. Medium pH modulates matrix, mineral, and energy metabolism in cultured chick bones and osteoblast-like cells. *Bone Miner*. 1994;24(1):59-73.
70. el-Ghannam A, Ducheyne P, Shapiro IM. Formation of surface reaction products on bioactive glass and their effects on the expression of the osteoblastic phenotype and the deposition of mineralized extracellular matrix. *Biomaterials*. 1997;18(4):295-303.
71. Kalmodia S, Molla AR, Basu B. In vitro cellular adhesion and antimicrobial property of SiO<sub>2</sub>-MgO-Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-K<sub>2</sub>O-B<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-F glass ceramic. *J Mater Sci Mater Med*. 2010;21(4):1297-309.
72. Renno ACM, Bossini PS, Crovace MC, Rodrigues ACM, Zanotto ED, Parizotto NA. Characterization and in vivo biological performance of biosilicate. *Biomed Res Int*. 2013;2013:141427-.
73. Yassen GH, Platt JA, Hara AT. Bovine teeth as substitute for human teeth in dental research: a review of literature. *J Oral Sci*. 2011;53(3):273-82.
74. Clark-Holke D, Drake D, Walton R, Rivera E, Guthmiller JM. Bacterial penetration through canals of endodontically treated teeth in the presence or absence of the smear layer. *Journal of dentistry*. 2003;31(4):275-81.
75. Pashley D, Okabe A, Parham P. The relationship between dentin microhardness and tubule density. *Dental Traumatology*. 1985;1(5):176-9.

76. Almeida L, Souza S, Sampaio A, Cavalcanti Y, Silva W, Cur A, et al. Effect of Collagen Matrix Saturation on the Surface Free Energy of Dentin using Different Agents. *The journal of contemporary dental practice*. 2015; 09/02;16:531-6.
77. Unnikrishnan M, Mathai V, Sadasiva K, Santakumari RSM, Girish S, Shailajakumari AK. The Evaluation of Dentin Microhardness After Use of 17% EDTA, 17% EGTA, 10% Citric Acid, MTAD Used as Chelating Agents Combined With 2.5% Sodium Hypochlorite After Rotary Instrumentation: An In Vitro SEM Study. *J Pharm Bioallied Sci*. 2019;11(Suppl 2):S156-S63.
78. Wang Y-L, Chang H-H, Chiang Y-C, Lin C-H, Lin C-P. Strontium ion can significantly decrease enamel demineralization and prevent the enamel surface hardness loss in acidic environment. *Journal of the Formosan Medical Association*. 2019; 2019/01/01;118(1, Part 1):39-49.
79. Saffarpour M, Mohammadi M, Tahiri M, Zakerzadeh A. Efficacy of Modified Bioactive Glass for Dentin Remineralization and Obstruction of Dentinal Tubules. *J Dent (Tehran)*. 2017;14(4):212-22.
80. Santos Cardoso O, Coelho Ferreira M, Moreno Carvalho E, Campos Ferreira PV, Bauer J, Carvalho CN. Effect of Root Repair Materials and Bioactive Glasses on Microhardness of Dentin. *Iran Endod J*. 2018; Summer;13(3):337-41.
81. Wang Z, Jiang T, Sauro S, Wang Y, Thompson I, Watson TF, et al. Dentine remineralization induced by two bioactive glasses developed for air abrasion purposes. *Journal of Dentistry*. 2011; 2011/11/01;39(11):746-56.
82. Sheng X-Y, Gong W-Y, Hu Q, Chen X-f, Dong Y-M. Mineral formation on dentin induced by nano-bioactive glass. *Chinese Chemical Letters*. 2016; 2016/09/01;27(9):1509-14.
83. Bohner M, Lemaitre J. Can bioactivity be tested in vitro with SBF solution? *Biomaterials*. 2009;30(12):2175-9.
84. Tirapelli C, Panzeri H, Lara EHG, Soares RG, Peitl O, Zanotto ED. The effect of a novel crystallised bioactive glass-ceramic powder on dentine hypersensitivity: a long-term clinical study. *Journal of oral rehabilitation*. 2011;38(4):253-62.
85. Kokubo T, Takadama H. How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity? *Biomaterials*. 2006;27(15):2907-15.
86. Pinheiro MC, Lopes BMV, Cavassim R, Pinto SCS, Sampaio JEC. In vitro evaluation of Biosilicate® dissolution on dentin surface: a SEM analysis. *Revista de Odontologia da UNESP*. 2013;42:251-8.
87. Jones JR. Reprint of: Review of bioactive glass: From Hench to hybrids. *Acta Biomater*. 2015;23 Suppl:S53-S82.

88. Huang X, Li R, Feng Y, Wang Y. Remineralization of demineralized dentin induced by bioactive glass NovaMin. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban.* 2018;43(6):619-24.

## ANEXO A – TERMO LIVRE DE DOAÇÃO DOS DENTES PARA A PESQUISA.



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA  
DEPARTAMENTO DE ODONTOLOGIA**

### **TERMO DE DOAÇÃO DE DENTES PRA A PESQUISA**

**Pesquisa:** “Avaliação das propriedades biológicas e físicas de biovidros experimentais para o tratamento da hipersensibilidade dentinária cervical: estudo in vitro e in vivo”.

**Pesquisador responsável:** Prof. Dr. Fábio André dos Santos.

Por esse instrumento particular, declaro, para os devidos fins éticos e legais, \_\_\_\_\_ que \_\_\_\_\_ eu,

\_\_\_\_\_,  
natural de \_\_\_\_\_, gênero \_\_\_\_\_, idade \_\_\_\_\_, data de nascimento \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_, RG \_\_\_\_\_, residente à \_\_\_\_\_, bairro \_\_\_\_\_, cidade \_\_\_\_\_, UF \_\_\_\_\_, CEP \_\_\_\_\_, telefone (\_\_\_\_) \_\_\_\_\_, aceito doar \_\_\_\_\_ dentes (s)

permanente(s) para utilização na pesquisa intitulada “Avaliação das propriedades biológicas e físicas de biovidros experimentais para o tratamento da hipersensibilidade dentinária cervical: estudo in vitro e in vivo”. Estou ciente de que este(S) dentes(s) será (serão) extraído(s) por indicação terapêutica, como documentado em meu prontuário e a cirurgia será realizada por pessoal capacitado para sua realização. Fui informado que o objetivo dessa pesquisa é avaliar o efeito de biovidros experimentais sobre células da polpa dentinária em laboratório.

Certifico também que fui informado dos riscos do procedimento de remoção do(s) dente(s), que incluem adversas e acidentes como: alergia aos componentes do anestésico, hemorragia, dor, fratura do dente ou osso, perda temporária ou definitiva de sensibilidade na região em caso de proximidade do dente com nervos, deglutição ou aspiração do dente. Porém, estou ciente de receberei totó o apoio e cuidados necessários pelo aluno e professor responsável pela execução desses procedimentos, a fim de minimizar esses



identidade preservada durante toda a execução do trabalho e na divulgação posterior dos resultados do estudo. Autorizo também a divulgação e publicação em revistas científicas, brasileiras ou estrangeiras, dos dados obtidos na pesquisa.

Em caso de qualquer outra dúvida, poderei contatar o pesquisador responsável pela pesquisa, Professor Doutor Fábio André Dos Santos, responsável pelo estudo, pelo telefone: (42) 99800-7454, para qualquer informação adicional em relação à pesquisa da qual participo.

Ponta Grossa, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20\_\_\_\_.

\_\_\_\_\_  
Assinatura do participante voluntario

\_\_\_\_\_  
Assinatura do pesquisador responsável

\_\_\_\_\_  
Assinatura e CRO do cirurgião-dentista  
responsável pelo procedimento

**Av. Carlos Cavalcanti, 4748 – Bloco M – Campus de Uvaranas – CEP: 84030-900 – Ponta Grossa – PR - Brasil**

## ANEXO B - APROVAÇÃO DO PROJETO PELA COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA DA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA (UEPG)

P3  
 40  
 K



PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
COMISSÃO DE ÉTICA DO USO DE ANIMAL

### CARTA DE APROVAÇÃO

**Processo CEUA – 039/2015**

**Protocolo UEPG – 10039/2015**

**Título – “Avaliação de um biovidro em nanopartículas para o tratamento da hipersensibilidade dentinária cervical. Estudo em ratos”**

**Interessado:** Fábio André dos Santos

**Data de Entrada – 13/07/2015**

**Resultado:** Aprovado

**Data/Prazo – 29/09/2015 a 28/09/2017**

**Considerações**

Prezado Professor Fábio André dos Santos:

Em relação à utilização de animais no projeto de pesquisa sob sua responsabilidade, a CEUA deliberou pela sua aprovação, por dois anos, o uso de 84 Ratos Wistar, machos, de 2 a 3 meses. **APROVADO.**

Atenciosamente,

*Prof<sup>te</sup> Dr<sup>a</sup> Maria Marta Loddi*  
**Coordenadora**



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA  
PROSP - CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais  
Prof<sup>te</sup> Dr<sup>a</sup> Maria Marta Loddi  
Coordenadora

Av. Gen. Carlos Cavalcanti, n° 4748, CEP 84.030-900 Campus Universitário em Uvaranas  
 Ponta Grossa - Paraná  
 Bloco da Reitoria - anexo à PROPCSP  
 Fone: (042) 3220-3264