

BRUNA DE OLIVEIRA REIS

**ANALYSIS OF PERMEABILITY AND BIOLOGICAL
PROPERTIES OF DENTIN TREATED WITH
EXPERIMENTAL BIOACTIVE GLASSES**

ARAÇATUBA - SP

2021

BRUNA DE OLIVEIRA REIS

**ANALYSIS OF PERMEABILITY AND BIOLOGICAL
PROPERTIES OF DENTIN TREATED WITH
EXPERIMENTAL BIOACTIVE GLASSES**

Tese apresentada à Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP, Faculdade de Odontologia de Araçatuba, como parte integrante dos requisitos para obtenção do título de DOUTORA, pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Área de Concentração em Dentística.

Orientador: Prof. Ass. Paulo Henrique dos Santos

ARAÇATUBA - SP

2021

Catálogo na Publicação (CIP)

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

- | | |
|-------|--|
| R375a | <p>Reis, Bruna de Oliveira.</p> <p>Analysis of permeability and biological properties of dentin treated with experimental bioactive glasses / Bruna de Oliveira Reis. – Araçatuba, 2020
98 f.: 6 il.; 6 tab.</p> <p>Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Orientador: Prof. Paulo Henrique dos Santos</p> <p>1. Sensibilidade da dentina 2. Dessensibilizantes dentinários
3. Permeabilidade da dentina 4. Biologia celular I. T.</p> <p>Black D2
CDD 617.6</p> |
|-------|--|

Dados Curriculares

Bruna de Oliveira Reis

Nascimento: 24/09/1990 – São Paulo - SP

Filiação: Salatiel de Oliveira e Lúcia de Oliveira

2009/2014: Curso de Graduação em Odontologia Universidade Estadual Paulista - UNESP, Faculdade de Odontologia de Araçatuba.

2015/2017: Curso de Pós-Graduação em Odontologia, área de concentração Dentística, nível de Mestrado, Universidade Estadual Paulista - UNESP, Faculdade de Odontologia de Araçatuba.

2017/2021: Obtenção dos créditos referentes ao curso de Pós-Graduação em Odontologia, área de concentração Dentística, nível de Doutorado, Universidade Estadual Paulista - UNESP, Faculdade de Odontologia de Araçatuba.

Dedicatória

Dedicatória

À Deus

Pelas inúmeras chances que me dá de aprender com a vida sobre aquilo que realmente importa. Amor que me protege, consola e guia para um propósito perfeito. Sem esse amor eu nada seria e muita coisa não faria sentido!

À minha mãe, Lúcia de Oliveira

Mãe amorosa, humilde, trabalhadora. Mesmo nascida em família muito grande, sem condições financeiras para estudar, sempre trabalhou para que eu pudesse ter o melhor dentro da nossa realidade e, principalmente, confiou nas minhas escolhas. Essa tese vai muito além de uma pós-graduação ou título, ela representa também a nossa união, empenho e o cumprimento das promessas de Deus na nossa vida. Te amo além da vida, mami. Obrigada!

Ao meu pai, Salatiel de Oliveira

Por ter me educado, ter sido presente, sempre paciente e amigo, me proporcionado muitos dias felizes! Uma pessoa marcada por histórias difíceis, que me ensina diariamente sobre resiliência. Obrigada por me incentivar, acreditar nos meus sonhos e me permitir vivê-los! Amo você, papi.

Aos meus tios, Elis Regina Oliveira Cotello e José Roberto Scalón Cotello

“Segundos pais”, que confiaram e investiram em mim, tornando possível a realização dos meus sonhos de estudar fora do país, na UNESP, me formar cirurgiã dentista, e mestre. Amo vocês e serei eternamente grata. Obrigada por todos os conselhos, paciência, amor e generosidade!

Ao meu esposo, Erik Neiva Ribeiro de Carvalho Reis

Por ser o meu companheiro, amigo e suporte diário. Me sinto muito abençoada por ter te encontrado e por tudo o que estamos construindo aos poucos, dentro da nossa intimidade, preservando os nossos valores. Com você a minha vida é muito melhor! Te amo e espero dividir muitas outras conquistas com você!

Agradecimentos
especiais

Agradecimentos especiais

Ao meu orientador e amigo, Prof. Dr. Paulo Henrique dos Santos

Um dos meus maiores exemplos de humildade, bondade, comprometimento e sabedoria. Foi um presente imensurável ter tido o privilégio de ser sua orientada por tantos anos e a oportunidade de fortalecermos nossos laços. Muito além de toda a ciência, soube respeitar o meu tempo de amadurecimento e me mostrar caminhos de forma cuidadosa. É motivo de orgulho para mim poder dizer que sou sua orientada porque admiro muito a sua forma de conduzir os trabalhos e alunos! Tenho o senhor como uma figura paterna, amiga, e a confiança de que posso contar nas horas difíceis. Conte sempre comigo também! O senhor mora no meu coração, professor. **OBRIGADA POR TANTO!**

Aos meus companheiros do início ao fim, Ana Teresa Maluly Proni, Thaís Yumi Umeda Suzuki e Henrique Badaoui Strazzi Sahyon (PAULETES A1 + PAULITO)

Eu amo como o nosso relacionamento se transformou do primeiro dia de “reunião dos orientados do professor Paulinho (ainda sem nosso cantinho, na biblioteca...)” até o que vivemos hoje! Olhando pra trás é muito reconfortante e dá uma paz muito grande saber que não apenas passamos pela vida um do outro, mas aprendemos com nossos erros, voltamos atrás quando preciso, nos ajudamos a amadurecer tanto cientificamente quanto pessoalmente, e escolhemos permanecer unidos independente das obrigações. Vocês fazem parte da minha base, são amigos, auxílios e socorros presentes. Obrigada por tudo! Amo cada um de vocês e estou aqui para o que der e vier!

À minha supervisora durante o Doutorado Sanduíche, Profa. Dra. Anuradha Prakki

Por todas as portas que me abriu desde o mestrado, quando ainda me conhecia muito pouco. Sempre me atendeu e ajudou da forma mais paciente, ágil e atenciosa possível. Ser recebida pela senhora em Toronto foi um privilégio muito grande. Me sinto extremamente abençoada por todo o conhecimento científico que compartilhou comigo, por expandir os meus horizontes, me apresentar tantas pessoas especiais, e acima de tudo, por não ter soltado da minha mão em nenhum momento. Espero um dia conseguir retribuir pelo menos um pouco de tudo o que fez por mim! **MUITO MUITO OBRIGADA, ANU!**

Ao meu braço direito em Toronto, Terry Alexander Stavroullakis

Pela infinita paciência que teve comigo durante todo o experimento me ensinando tudo detalhadamente, topando os finais de semana de muito trabalho, respeitando o meu tempo de aprendizado, e acima de tudo, por ter tornado os meus dias mais leves e melhores com boas conversas e muita comida! Uma pessoa extremamente educada, gentil e bondosa que carregarei para sempre no coração com muito carinho. Um amigo e ser humano muito especial.

Agradecimientos

Agradecimentos

À **Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP, Faculdade de Odontologia de Araçatuba** pela oportunidade de fazer parte do programa de pós-graduação desta instituição. Tenho muito orgulho de ser unespiana e de fazer parte dessa casa desde a minha graduação. Meu eterno respeito, gratidão e admiração!

À **Universidade de Toronto, Faculdade de Odontologia**, por todas as vezes que me recebeu e me deu a oportunidade de aprender com seus grandes mestres, estudantes, demais funcionários e sistema. Uma instituição referência, que não só recebe como fornece todo o suporte necessário para o visitante de maneira organizada e atenciosa.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Convênio CAPES-PRINT-UNESP** pelas concessões das Bolsas de Doutorado e Doutorado Sanduíche, indispensáveis para a realização deste trabalho.

Ao **Prof. Dr. Eduardo Bresciani**, por sempre me atender prontamente com muita gentileza e atenção, colaborando para o desenvolvimento de trabalhos. Um professor que admiro muito pela qualidade das pesquisas que desenvolve e pela forma de se relacionar com as pessoas ao redor. É sempre muito bom poder contar com essa parceria. Muito obrigada!

Ao coordenador do Programa de Pós-Graduação em Odontologia, professor que se faz presente, e uma inspiração, **Prof. Dr. André Luiz Fraga Briso**. Pelas diversas oportunidades que me deu de me desenvolver e viver experiências importantes na pós-graduação. Sempre aprendo muito com tudo o que tem a comentar durante seminários e convivência, e o considero um professor brilhante! Muito criativo, ativo e direto. Obrigada por todo o suporte, atenção e amizade.

Ao **Prof. Dr. Renato Herman Sundfeld**, uma referência nacional científica e também de humildade. Professor atencioso, detalhista, que ensina muito através de pequenos gestos. É uma honra poder fazer parte da equipe de Dentística da FOA e conviver com pessoas como o senhor. Obrigada por todos os ensinamentos e carinho.

À **Profª. Dra. Ticiane Cestari Fagundes Tozzi**, pela enorme participação durante praticamente toda a minha vida acadêmica. Desde a graduação me permitiu estar próxima e dividiu comigo muito além de conhecimento científico e prático odontológico, mas experiências e conselhos que levarei para a vida. Obrigada pela paciência e inúmeras chances. Tenho muito carinho pela senhora!

Aos professores **Luciano Tavares Angelo Cintra, Sandra Helena Penha Oliveira e Aline Takamiya**, por toda o suporte durante graduação, pós-graduação e, especialmente, desenvolvimento deste trabalho. Muito obrigada pela atenção e carinho sempre!

Aos professores **Lucas Silveira e Nubia Pini**, pelo período de convivência na pós-graduação, pelos ensinamentos, bons momentos compartilhados, e especialmente por prontamente aceitarem o convite de participarem dessa etapa da minha vida como membros suplentes da banca avaliadora. Muito obrigada pelo carinho!

A todos os **professores do curso de Graduação e Pós-Graduação** da Faculdade de Odontologia de Araçatuba (UNESP), pela oportunidade de crescimento e por todo conhecimento científico compartilhado.

Aos **funcionários do Departamento de Odontologia Preventiva e Restauradora** da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, agradeço por estarem sempre dispostos a ajudar com muita competência, paciência e atenção; colaborando para o sucesso de todos os trabalhos.

Às funcionárias da secretaria de pós-graduação, **Valéria Zagato, Critiane Lui e Lilian Mada**, pela paciência no esclarecimento e resolução dos problemas burocráticos no decorrer de todos os anos de convivência.

Aos **pacientes**, pela confiança depositada em nós pós-graduandos, permitindo-nos aprimorar habilidades e contribuindo para a ciência.

Aos demais colegas também orientados pelo professor Paulinho, **Claudia Simões, Júlia Moro, Larissa Sgarbosa, Mariana Queiroz, Mariana Sati, Murilo Torres, Renata Gallo, e Ritipael Costa**, pela disponibilidade e parceria. Muito obrigada por tudo!

Ao amigo e parceiro de pós-graduação, **Caio César Pavani**, por toda ajuda durante as clínicas de reabilitação como minha dupla, e demais atividades da Dentística! Sempre compartilhando comigo aprendizados e boas risadas. Muito obrigada por tudo!!

Aos demais colegas da pós-graduação em Dentística, **Diego Mardegan, Fernanda Ramos, Ísis Hoshino, Lara Esteves, Laryssa de Castro, Lívia Valentim, Laura Vieira, Sibele Alcântara, Mariana Moda e Marjorie Gallinari**, por serem sempre presentes e dispostos a ajudar. Um time muito esforçado que merece muito sucesso. Obrigada por toda a ajuda!!

À colega de departamento, e agora professora na UFMG, **Francine Benetti**, por toda a atenção e ajuda nos aprendizados sobre o preparo dos biovidros.

Ao **Departamento de Materiais Dentários e Prótese** da Faculdade de Odontologia de Araçatuba (UNESP) e ao professor **Wirley Assunção**, pela recepção e autorização do uso da cortadeira, fundamental para a realização deste trabalho.

Ao professor **Alberto Carlos Botazzo Delbem**, pela recepção e autorização do uso de equipamentos também indispensáveis para a realização deste trabalho.

Ao **Laboratório de Odontologia Restauradora** do **Instituto de Ciência e Tecnologia - UNESP, Campus de São José dos Campos**, em especial ao e colegas de pós-graduação **Rafael Rocha e Maurício Yugo de Souza** (orientados pelo professor Eduardo Bresciani) por todo o suporte e ajuda nas minhas diversas idas para realização das análises de permeabilidade, espectroscopia por energia dispersiva e microscopia eletrônica de varredura.

Ao **Laboratório de Materiais Odontológicos e Prótese da Faculdade de Odontologia do Instituto de Ciência e Tecnologia - UNESP, Campus de São José dos Campos (UNESP)**, em especial à atendente de suporte acadêmico **Thaís Paradella**, pela realização das análises de espectroscopia por energia dispersiva e microscopia eletrônica de varredura.

Ao **Laboratório de Microscopia da Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira (UNESP)**, em especial ao atendente de suporte acadêmico **Elton José de Souza**, pelo empenho e gentileza para a realização de algumas imagens de microscopia eletrônica de varredura.

Aos **colegas de pós-graduação do Departamento de Diagnóstico e Cirurgia** da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP, sempre presentes e dispostos a ajudar. Muito obrigada!

Aos meus principais companheiros do dia a dia na Universidade de Toronto, **Arwa Bafail, Beshr, Najm, Graziella Molska, Professora Karina Carneiro, Professora Daniela Micheliní, Professora Grace Souza, Sandro e Natália Bittencourt**; em especial, **Janaína Bortolatto e Denise Lore**, por exatamente tudo o que fizeram por mim, da minha chegada à minha partida. Fizeram de Toronto uma segunda casa, dividiram comigo os melhores e piores momentos, e me ensinaram muito em diversos aspectos. Muito obrigada por cada detalhe. Não vejo a hora de nos reencontrarmos para matar a saudade! Vocês são muito especiais.

À minha melhor amiga e irmã de alma, **Mariana Alves de Sousa Fraga**, por ser presente desde sempre, compartilhando todas as dificuldades e vitórias da vida! Um dos corações mais generosos que já conheci. Te amo além da vida! Obrigada por tudo!!!

À minha prima, **Tainara Talita de Oliveira**, que foi a minha principal companhia na estadia fora do país, caminhando comigo todos os passos, dividindo as alegrias e sofrimentos e tornando os dias de saudade de casa mais leves. Sem você eu provavelmente não teria conseguido! Obrigada por tudo, minha boneca!! Estarei sempre aqui por você.

A todos os meus **famíliares**, pelo amor incondicional e apoio em todas as fases da minha vida.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para que esse trabalho fosse concluído
deixo o meu MUITO OBRIGADA!

*“A vitória mais bela que se pode alcançar é a
vitória sobre si mesmo.”*

Santo Inácio de Loyola

Resumo

OLIVEIRA-REIS, B. Análise da permeabilidade e propriedades biológicas da dentina tratada com vidros bioativos experimentais. [tese]. Araçatuba: Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Odontologia; 2021.

Resumo

O objetivo deste estudo foi avaliar a capacidade obliteradora de diferentes agentes dessensibilizantes em dentina humana através da mensuração da permeabilidade dentinária, e suas performances biológicas através da análise de citotoxicidade em fibroblastos gengivais humanos. Cinquenta molares humanos foram utilizados, dos quais foram obtidos blocos de dentina (4x4x1mm) posteriormente distribuídos em grupos de acordo com o dessensibilizante a ser utilizado (n=10): Grupo 1 - Controle (Saliva artificial. Sem aplicação de agente dessensibilizante); Grupo 2 - Ultra EZ (Ultradent); Grupo 3 - Desensibilize Nano P (FGM); Grupo 4 - Vidro Bioativo T5-OH (solução experimental); Grupo 5 - Vidro Bioativo F18 (solução experimental). Os tratamentos dessensibilizantes foram realizados durante 15 dias. Além disso, os espécimes foram

submetidos ao desafio com ácido cítrico para simular condições desmineralizantes do ambiente oral. As amostras foram submetidas à análise de permeabilidade antes e após os procedimentos dessensibilizantes e o desafio ácido. Análise de citotoxicidade foi realizada pelo ensaio Alamar Blue complementado pela quantificação de proteína pelo Método BCA (ácido bicinconínico) (N=3; n=3) nos tempos de avaliação de 15 minutos, 24 horas e 48 horas. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e Espectroscopia de Raio-X por Energia Dispersiva (EDS) foram realizadas para análise qualitativa da dentina tratada. Dados de permeabilidade dentinária foram analisados por ANOVA dois fatores medidas repetidas e Teste de Tukey ($\alpha=0,05$). Para a citotoxicidade, foram utilizados os testes Kruskal-Wallis e Newman-Keuls ($\alpha=0,05$). Os resultados mostraram que para a permeabilidade dentinária não houve diferença significativa entre os agentes dessensibilizantes após os tratamentos ($p>0,05$), porém o grupo controle apresentou os maiores valores ($0,131 \pm 0,076$ Lp, $p<0,05$). Após o desafio ácido, o grupo controle manteve os maiores valores ($0,044 \pm 0,014$ Lp) com diferença significativa para os demais grupos ($p<0,05$), exceto para o Desensibilize Nano P ($0,037 \pm 0,019$ Lp). Quanto à citotoxicidade, não houve diferença entre os grupos experimentais ($p>0,05$). Assim, foi possível concluir que o uso de dessensibilizantes à base de biovidros causou efeito similar ao uso de produtos disponíveis comercialmente, em relação à permeabilidade e propriedades biológicas da dentina.

Palavras-chave: Sensibilidade da Dentina. Dessensibilizantes Dentinários. Permeabilidade da Dentina. Biologia Celular.

Abstract

OLIVEIRA-REIS, B. Analysis of permeability and biological properties of dentin treated with experimental bioactive glasses. [thesis]. Araçatuba: São Paulo State University, School of Dentistry; 2021.

Abstract

The aim of this study was to evaluate the obliterating capability of different desensitizing agents on human dentin by measuring dentin permeability, and their biological performance by the analysis of cytotoxicity in human gingival fibroblasts. Fifty human molars were used, from which dentin blocks were obtained (4x4x1mm) and distributed in groups according to the desensitizing agent used (n=10): Group 1 - Control (Artificial saliva. No desensitizing agent applied); Group 2 – Ultra EZ (Ultradent); Group 3 – Desensibilize Nano P (FGM); Group 4 - T5-OH Bioactive Glass (Experimental solution); Group 5 - F18 Bioactive Glass (Experimental solution). The desensitizing treatments were performed for 15 days. In addition, the specimens were subjected to challenge with citric acid to simulate oral environment demineralizing conditions. Samples were subjected to permeability analysis before and after the desensitizing procedures and the acid challenge. Cytotoxicity analysis was performed by using Alamar Blue assay and complemented by total protein quantification by Pierce Bicinchoninic Acid (BCA) assay

(N=3; n=3) at 15 minutes, 24-hour and 48-hour time points. Scanning electron microscopy (SEM) and energy dispersion X-ray spectroscopy (EDS) were performed for qualitative analysis of treated dentin. Data of dentin permeability was analyzed by two-way repeated measures ANOVA and Tukey's *post-hoc* test ($\alpha=0.05$). For cytotoxicity, Kruskal-Wallis and Newman-Keuls tests were used ($\alpha=0.05$). The results showed that for dentin permeability there was no significant difference among the desensitizing agents after treatment ($p>0.05$), but the control group presented the highest values (0.131 ± 0.076 Lp, $p<0.05$). And after acid challenge, the control group maintained the highest values (0.044 ± 0.014 Lp) with significant difference to the other groups ($p<0.05$), except for Desensibilize Nano P (0.037 ± 0.019 Lp). For cytotoxicity, there were no significant differences among the experimental groups ($p>0.05$). It was concluded that the use of bioglass-based desensitizers caused similar effects to commercially available products, regarding permeability and dentin biological properties.

Keywords: Dentin Sensitivity; Desensitizing Agents; Dentin Permeability; Cell Biology.

Listas e Sumário

Lista de Figuras

Figura 1:	Design of the study.....	53
Figura 2:	Section of the dentin cut.....	53
Figura 3:	Representative scanning electron microscopy micrograph (A1: 500X, A2: 2000X, A3: 5000X) of a dentin block before surface treatment....	54
Figura 4:	Representative scanning electron microscopy micrograph (A1: 500X, A2: 2000X, A3: 5000X) of a dentin block after the preparation for the dentin permeability analysis using 17% EDTA.....	54
Figura 5:	Representative scanning electron microscopy micrographs (1: 500X, 2: 2000X, 3: 5000X) of dentin blocks after treatments (A: control, B: Ultra EZ, C: Desensibilize Nano P, D: T5-OH Bioactive Glass, E: F18 Bioactive Glass).....	55
Figura 6:	Representative scanning electron microscopy micrographs (1: 500X, 2: 2000X, 3: 5000X) of a dentin block after acid challenge (A: control, B: Ultra EZ, C: Desensibilize Nano P, D: T5-OH Bioactive Glass, E: F18 Bioactive Glass).....	56

Lista de Tabelas

Tabela 1:	Description of the composition, manufacturers, and application protocols of selected products.....	57
Tabela 2:	ANOVA table for dentin permeability measurements (Lp).....	57
Tabela 3:	Dentin permeability measurements (Lp; mean $\pm$ s.d.) of the different desensitizing agents, before and after treatments, and after acid challenge.....	58
Tabela 4:	Results of energy-dispersive X-ray analysis (EDS) measurements (control group) in weight per cent (%wt).....	58
Tabela 5:	Cytotoxicity of products (expressed by means of mortality percentages $\pm$ s.d.) to gingival fibroblasts within different evaluation times.....	59
Tabela 6:	Average ($\pm$ s.d.) total protein concentrations (mg/ml) within different evaluation times.....	59

Lista de Abreviaturas, Símbolos e Siglas

mm	= milímetro (millimeter)
=	= igual (equal)
BCA	= Ácido bicinconínico (Bicinchoninic Acid)
SEM	= Microscopia Eletrônica de Varredura (Scanning Electron Microscopy)
EDS	= Espectroscopia de raio-x por dispersão em energia (Energy Dispersion X-ray Spectroscopy)
α	= alfa (alpha)
>	= maior (greater)
Lp	= condutância hidráulica (hydraulic conductance)
<	= menor (less than)
$\pm$	= mais ou menos (more or less)
pH	= potencial hidrogeniônico (potential of hydrogen)
#	= número (number)
HGF	= Fibroblastos Gengivais Humanos (Human Gingival Fibroblasts)
ATCC	= American Type Culture Collection

°C	= grau Celsius (degree Celsius)
Ltd.	= Limitada (Limited)
EDTA	= Ácido etilenodiamino tetra-acético (Ethylenediamine tetraacetic acid)
psi	= libra-força por polegada quadrada (pounds per square inch)
µl	= microlitro (microliter)
min	= minuto (minute)
cm ²	= centímetro quadrado (square centimeter)
cm	= centímetro (centimeter)
H ₂ O	= água (water)
ml	= mililitro (milliliter)
g	= grama (grams)
%	= percentagem (percentage)
Wt%	= porcentagem de peso (weight percentage)
Ca ²⁺	= Cálcio (Calcium)
P	= Fósforo (Phosphorus)
Cps	= Contagens por segundo (counts per second)
FBS	= Soro bovino fetal (Fetal bovine serum)
IU	= Unidade Internacional (International Unit)
µg	= micrograma (microgram)

PBS	= Solução salina tamponada com fosfato (Phosphate buffered saline)
nm	= nanometro (nanometer)
RIPA	= Ensaio de Radioimunoprecipitação (Radioimmunoprecipitation assay)
MTT	= Ensaio de viabilidade celular colorimétrico (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)
$\geq$	= maior ou igual (greater or equal)
μm	= micrometro (micrometer)
ANOVA	= Análise de variância (Analysis of Variance)
et al.	= e colaboradores (and others)
L	= litro (liter)
mg	= miligrama (miligram)
n	= número amostral (sample size)
p	= probabilidade de significância (significance probability)

Sumário

1	Introdução e Proposição.....	27
2	Materiais e Método.....	30
	2.1 Delineamento experimental.....	30
	2.2 Preparo dos espécimes de dentina.....	31
	2.3 Avaliação da permeabilidade dentinária.....	32
	2.3.1. Tratamentos dessensibilizantes.....	33
	2.3.2. Desafio com ácido cítrico.....	33
	2.3.3. Avaliação final da permeabilidade dentinária.....	33
	2.3.4. Microscopia eletrônica de varredura.....	34
	2.3.5 Espectroscopia de raio-X por energia dispersiva.....	34
	2.4. Avaliação das propriedades biológicas.....	34
	2.4.1. Tratamentos dessensibilizantes.....	34
	2.4.2. Cultura celular, condições de crescimento e estímulo dessensibilizante..	35
	2.4.3. Avaliação da citotoxicidade - Alamar Blue.....	35
	2.4.4. Avaliação da quantificação de proteínas pelo método BCA.....	36
	2.5 Análise estatística.....	37
3	Resultados.....	37
	3.1. Permeabilidade dentinária.....	37
	3.2. Citotoxicidade - Alamar Blue.....	38
	3.3. Quantificação de proteínas pelo método BCA.....	38
4	Discussão.....	39

5	Conclusão.....	43
6	Referências.....	43
7	Anexos.....	60

Analysis of permeability and biological properties of dentin treated with experimental bioactive glasses

Abstract

Objectives: To evaluate obliterating capability and biological performance of desensitizing agents. Methods: 50 dentin blocks were distributed according to the desensitizing agent used (n=10): Control (Artificial saliva); Ultra EZ (Ultradent); Desensibilize Nano P (FGM); T5-OH Bioactive Glass (Experimental solution); F18 Bioactive Glass (Experimental solution). Desensitizing treatments were performed for 15 days. In addition, specimens were subjected to acid challenge to simulate oral environment demineralizing conditions. Samples were subjected to permeability analysis before and after desensitizing procedures and acid challenge. Cytotoxicity analysis was performed by using Alamar Blue assay and complemented by total protein quantification by Pierce Bicinchoninic Acid assay at 15 minutes, 24-hour and 48-hour time points. Scanning electron microscopy and energy dispersion X-ray spectroscopy were performed for qualitative analysis. Data of dentin permeability was analyzed by two-way repeated measures ANOVA and Tukey's test. For cytotoxicity, Kruskal-Wallis and Newman-Keuls tests. Results: for dentin permeability there was no significant difference among desensitizing agents after treatment, but control group presented highest values (0.131 ± 0.076 Lp). After acid challenge, control group maintained highest values (0.044 ± 0.014 Lp) with significant difference to other groups, except for Desensibilize Nano P (0.037 ± 0.019 Lp). For cytotoxicity, there were no significant differences among groups. Conclusion: Bioglass-based desensitizers caused similar effects to commercially available products, regarding permeability and dentin biological properties. Clinical

significance: There is no gold standard protocol for dentin sensitivity. The study of novel desensitizing agents that can obliterate dentinal tubules in a faster-acting and long-lasting way may help meet this clinical need.

Keywords: Dentin Sensitivity; Desensitizing Agents; Dentin Permeability; Cell Biology.

1. INTRODUCTION

Dentin hypersensitivity is a very common clinical condition in dentistry [1]. It is characterized by a distinct painful process, short and needling, not linked to a pathological process, resulting from the response of dentin exposure to abrasive, chemical or osmotic (ingestion of acidic foods, especially citrus and sweet fruits), and physical stimuli (thermal and electrical changes) [1,2]. The best accepted theory regarding the mechanism of dentin hypersensitivity was proposed by Brännström [3], which suggests that the pain-provoking stimuli would increase the flow of dentinal fluid within dentinal tubules or alter the direction of the flow. This would stimulate the nerves around odontoblast cells, causing hypersensitivity [1,3]. The understanding of the hydrodynamic mechanism suggests that the closure of dentinal tubules (which would reduce fluid flow and dentinal permeability) as well as the interdental reduction of nerve excitability (by applying chemical agents, for example) are the two main strategies for treatment of dentin hypersensitivity, which requires the use of products capable of desensitizing the dentin [1,4-9].

Although there is an extensive range of such home and professional products available [8,10-16], a gold standard desensitizing agent still needs to be established [15,17]. An ideal treatment for dentin hypersensitivity is expected to be effective in long term, cost effective and simple usage [15,17,18]. Mouthwashes, toothpastes, and gels are

the most commonly used desensitizing agents as they are cost effective [15,18,19]. The mechanism of action of these agents usually occurs either by depolarization of the nervous impulse or occlusion of the dentinal tubules [15,18,19]. For depolarizing action, the agent must contain potassium nitrate [15,18,19]. It is believed that the increase in extracellular potassium concentration around nerve fibers is capable of depolarizing and preventing them from being repolarized through blockage of the nerve stimulation passage [15]. In order for an agent to be able to occlude dentinal tubules, it must physically block them by precipitating salts on the dentin surface, limiting the fluid flow through these tubules [13,15,20]. Adhesive systems, commercial monomers/glutaraldehyde based desensitizers, calcium carbonate, sodium fluoride, tin fluoride, hydroxyapatite, and oxalates are some examples of sealing agents proposed so far [8,15,21-24].

Adhesive systems and commercial monomers/glutaraldehyde based desensitizers are commonly used to reduce dentin permeability because of their acceptable long-term stability and low cytotoxicity, but besides the high cost, they can present complex and sensitive protocols of application [25-27]. Calcium carbonate, fluorides, hydroxyapatite, and oxalates also promote occlusion and seal of dentinal tubules through the formation of barriers resistant to acids and temperature dissolution, but there is still no consensus as to efficacy in the literature [27]. In this context, due to the established role of fluorides in teeth remineralizing process, calcium phosphate releasing molecules have been added to most commercial products in various forms and concentrations [28]. Among the many products commercialized with such characteristics are Ultra EZ (Ultradent) and Desensibilize Nano P (FGM) desensitizing agents. The remineralization effectiveness of these fluorine-containing materials is related to their content, the presence of fluoride matrices, and the properties of the remaining components of the materials [28,29].

Scientific and technological advances have brought the alternative of using bioactive products, employing nanotechnology in calcium and phosphate particles, which promise to act both physically by obliterating the tubules and chemically by depolarizing nerve fibers [30,31]. Together, the presence of fluoride complements the desensitizing effect [30,31]. Researches have also shown interest in the use of bioactive glasses, which are highly biocompatible materials containing calcium and sodium phosphosilicate [1]. Due to their ability to form calcium phosphate precipitates in physiological liquid medium, forming chemical bonds with soft and/or hard body tissues (bones and teeth), their role in the processes of remineralization and regeneration have been studied [1,32]. Such property, coupled with proper particle size, provides potential sealing effect on dentinal tubules with promotion of remineralization and inhibition of dentin demineralization [1,33,34]. As in clinical practice, the application of these products can reach gingival and pulpal tissues. Hence, it is also important to consider and evaluate their cytotoxic effects on primary human cells, such as odontoblast-like cells, pulp fibroblast cells, gingival fibroblasts, among others [35]. Regardless of the product of choice, the biggest challenge in treating dentin hypersensitivity is still achieving long-term effectiveness. This is due to the behavior of the desensitizing agents when exposed to the huge variation of oral environment conditions including pH fluctuations.

Thus, the objective of the present study was to evaluate the *in vitro* effects of the application of different desensitizing agents (Ultra EZ - Ultradent; Desensibilize Nano P - FGM; T5-OH Bioactive Glass - Experimental solution; and F18 Bioactive Glass - Experimental solution) on human dentin submitted to acid challenge. The dentin permeability and biological performance of the products analyzed by cytotoxicity assays were evaluated. The null hypothesis tested were: (1) There would be no change in the dentin permeability after treatment with different desensitizing agents and after acid

challenge; and (2) There would be no difference in the cytotoxicity against fibroblast cells exerted by the evaluated desensitizing agents.

2. MATERIALS AND METHOD

This research was conducted after approval by the Local Institutional Review Board (Process #83739318.4.0000.5420).

2.1. Design of the study

In the present study, the response variables were the permeability of the dentin treated with desensitizing agents, and cytotoxicity of the desensitizing agents against human gingival fibroblasts (HGF-1, ATCC[®] CRL2014[™], Manassas, Virginia, United States). The later was evaluated by Alamar Blue and protein quantification BCA method. For the study of the dentin permeability, two experimental factors were analyzed: (1) Desensitizing agents at five levels (Control - no treatment; Ultra EZ - Ultradent; Desensibilize Nano P - FGM; T5-OH Bioactive Glass - Experimental solution; and F18 Bioactive Glass - Experimental solution); and (2) evaluation times at two levels (before and after the acid challenge) (n=10). Representative samples from each group were used for qualitative analysis of the dentin by scanning electron microscopy and energy dispersion X-ray spectroscopy analysis.

For the study of cytotoxicity by Alamar Blue, two experimental factors were analyzed: (1) Desensitizing agents at five levels (Control - no treatment, Ultra EZ - Ultradent, Desensibilize Nano P - FGM, T5-OH Bioactive Glass - Experimental solution, and F18 Bioactive Glass - Experimental solution); and (2) evaluation times at three levels (15 minutes, 24 hours, and 48 hours after treatment). For the study of cytotoxicity by protein quantification by BCA method, two experimental factors were analyzed: (1)

Desensitizing agents at six levels (Control 1 - cells with no treatment, Control 2 – cells treated with distilled water, Ultra EZ - Ultradent, Desensibilize Nano P - FGM, T5-OH Bioactive Glass - Experimental solution, and F18 Bioactive Glass - Experimental solution); and (2) evaluation times at three levels (15 minutes, 24 hours, and 48 hours after treatment). The treatment with desensitizers was performed directly on cells (N=3; n=3). An overview of the experimental design is represented in Figure 1.

2.2. Preparation of the dentin specimens

Fifty freshly extracted human molars obtained from patients 18-45 years of age were selected and used according to the Ethics Committee's guidelines.

Specimens were cleaned with curettes, immersed in 2.5% sodium hypochlorite solution in water for ten minutes at room temperature to remove organic debris, then washed with distilled water and frozen at -6°C, until the start of the experiment. Teeth with clinical evidence of caries, root resorption, cracks or fractures were excluded from the study.

After cleaning, the teeth had their crowns separated from the roots at the amelocementum junction using a low-speed diamond disk (Isomet 5000, Buehler Ltd, Lake Bluff, Illinois, United States) under water cooling. Next, the crowns were fixed on a sticky wax acrylic plate, and with the aid of a double-sided diamond disk coupled with a hand piece and constant irrigation, approximately 1.5mm thick dentin slices were obtained (Figure 2). The surfaces were manually finished with hand circular movements with #400 and #600-grit silicon carbide papers (Extex Corp., Enfield, Connecticut, United States) to provide dentin blocks with a square shape and to ensure 1 mm thickness, verified with a digital caliper (model CD-6" CX-B, Mitutoyo Sul América Ltd., Suzano, São Paulo,

Brazil). The specimens were cleaned in deionized water and individually stored at 10°C until further analysis.

2.3. Evaluation of dentin permeability

The obtained dentin blocks were submitted to an initial permeability standardization process in which they were immersed for five minutes in 17% ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) solution (pH 7.4) (Apothicário, Araçatuba, São Paulo, Brazil) to open the dentinal tubules [16]. Dentin blocks were then washed with distilled water and stored in a humid environment until analysis [16]. Then, the specimens were submitted to an initial permeability test to standardize the measurements of fluid movement through the dentinal tubules. Comparing different samples, those with high discrepancy in the permeability values were eliminated from the experiment. Specimens whose permeability remained around the same mean were randomly distributed among the five experimental groups.

To perform the analysis, specimens were coupled to a fluid infiltration system apparatus (THDO3d Apparatus, Series WMD 3001, Odeme, Luzerna, Santa Catarina, Brazil). This simulates the flow through dentin due to intrapulpal pressure, under 10 psi pressure of constant deionized water working. For each analysis, a new air bubble was inserted into the system and its linear displacement (mm) through the microcapillary (100 μ L) was measured for three minutes using a digital scale caliper. This analysis was repeated three times for each specimen. The arithmetic displacement mean among the three readings was calculated, converted to flow volume (μ l/min), and transformed into hydraulic conductance (L_p ; μ l.cm²/min.cm H₂O). The hydraulic conductance considers the area of the specimen through which the water flowed (area = 0.16cm²), the system pressure (10psi) and the flow volume (100 μ l) [16].

2.3.1. Desensitizing treatments

The description of the composition, manufacturers, and application protocols of the products employed in each group is shown in Table 1. After application of the products, the dentin specimens were thoroughly rinsed with distilled water.

For simulation of commercially available products, the T5-OH and F18 Bioactive Glass particles were mixed with distilled water. A 2ml tube (Microtubes safe-lock, Eppendorf Brazil, São Paulo, São Paulo, Brazil) containing 0.1g of bioactive glass powder was filled with 1ml of water, which provided a 1:10 mixture of each bioactive glass in distilled water [36].

After application of the different materials, the dentin permeability analysis was performed in the same way as previously described.

2.3.2. Citric acid challenge

After the treatments described above, the samples were challenged with citric acid to simulate erosive demineralization. A follow-up permeability analysis was performed to test the stability caused by for desensitizing agent's obliteration.

The dentin specimens underwent an acid challenge cycle for seven days according to the following protocol: immersion in 0.5% citric acid solution (1ml/sample) (pH 2.5) (Apothicário, Araçatuba, São Paulo, Brazil) six times a day for two minutes each, under agitation. Between immersions, samples were stored in artificial saliva at 37°C [37].

2.3.3. Final evaluation of the dentin permeability

The dentin permeability analysis, after application of the different materials and after the acid challenge, was performed in the same way as previously described.

2.3.4. Scanning Electron Microscopy (SEM)

Representative samples from each group were fixed in metallic stubs, gold sputter coated, and taken into a scanning electron microscope (Inspect S50, FEI, Tokyo, Japan) to obtain images in 500X, 2000X and 5000X magnifications for qualitative analysis of the dentinal tubules in all phases of the experiment (initial, after treatments, and after acid challenge).

2.3.5. Energy dispersion X-ray Spectroscopy (EDS)

Energy dispersion X-ray spectroscopy measurements were performed on two representative samples from each group. The content of the elements in weight percentage (wt%) of calcium (Ca) and phosphorus (P) was measured using EDS BRUKER detector and Espirit 1.9 software (© 2015 Bruker Nano GmbH, Berlin, Germany). The count rate was 7000 counts per second (cps) with a dead time interval of 5%. The measurement time was one minute and 30 seconds. The arithmetic mean was performed within measurements of each specimen.

2.4. Biological properties analysis

2.4.1. Desensitizing treatments

As previously mentioned (section 2.1), for the study of the cytotoxicity, the treatment with desensitizers was performed directly on the cells.

The experimental solutions of T5-OH Bioactive Glass and F18 Bioactive Glass were prepared as described in the item 2.3.1. In the case of the commercially available

products, such as Ultra EZ and Desensibilize Nano P, a 50% dilution in distilled water was prepared and used directly in culture medium [35]. The materials were applied as follows:

- Control 1 (only cells): no treatment;
- Control 2 (distilled water); Ultra EZ diluted in distilled water (50%); Desensibilize Nano P diluted in distilled water (50%); T5-OH Bioactive Glass diluted in distilled water (10%); and F18 Bioactive Glass diluted in distilled water (10%); 15 minutes cell treatment, once a day.

2.4.2. Cell culture, growth conditions and desensitizing stimuli

To evaluate the cellular response against experimental materials, immortalized cells of gingival fibroblastic lineage were used (HGF-1 ATCC CRL-2014). Cells were grown in Dulbecco modified Eagle's Medium (DMEM, SIGMA Chemical Co., St. Louis, Missouri, United States) containing 10% fetal bovine serum (FBS), 100 IU/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin. The explants were maintained at 37°C in humidified atmosphere containing 5% CO₂ and 95% air. The cells had the culture medium renewed every two days and were subcultured whenever they reached 80-90% confluence using 0.25% trypsin, 0.53mM EDTA solution. Then the cell concentration was adjusted by a manual cell counter to 5,000 cells per well and these were plated inside 96-well plates for 15 minutes, 24-hour, and 48-hour (one plate for each timepoint) treatments. After 24 hours seeding, the attached cells received the treatments. The desensitizing agents were applied (as described in section 2.4.1) simulating clinical conditions.

2.4.3. Cytotoxicity Analysis – Alamar Blue

To assess cytotoxicity, the cells were seeded at a concentration of 5×10^5 cells/mL in 96-well flat-bottom tissue culture plates in 200 μ L culture medium and left to grow for 24 hours before experiments. Subsequently, the cells were removed and washed once with phosphate buffered saline (PBS). Fifty μ L of the stock solution (Ultra EZ, Desensibilize Nano P, T5-OH Bioactive Glass and F18 Bioactive Glass) was added and incubated for five minutes in the plate shaker; 150 μ L of the culture medium was shaken in the plate for 30 seconds; then samples were incubated for 15 minutes.

At the desired timepoint (15 minutes, 24 hours and 48 hours), the media was aspirated and saved in Eppendorf tubes, the cells were washed three times with 100 μ L PBS, and 100 μ L of fresh media was added. At the end, 10 μ L of Alamar Blue reagent (Invitrogen Carlsbad, California, United States) was added and the cells incubated for a minimum of four hours. After the incubation period, the plate was read at absorbance wavelengths of 570nm and 600nm subtracting the absorbance of 600nm from that of 570nm. Low values with low metabolic activity/ indicate cytotoxicity [38].

2.4.4. Protein Quantification by Pierce Bicinchoninic Acid (BCA) Method

Immediately following the Alamar Blue reading, the cells were washed with cold PBS three times; 100 μ L 1X Radioimmunoprecipitation assay buffer (RIPA buffer) (Cell Signaling #9806) was added to each well. Cells were incubated in ice for five minutes.

The cells were scraped and briefly sonicated. The samples were centrifuged for ten minutes at 14,000x g in a cold centrifuge; the supernatants removed, and the pellet discarded. The total protein content was determined, and the absorbance read at 562nm, using the BCA assay (Thermo Scientific 232225, Waltham, Massachusetts, United States). A standard curve was used to convert the absorbance values to mg/mL for protein concentrations [39].

2.5. Statistical analysis

Data of dentin permeability and cytotoxicity evaluations were subjected to normality test (Shapiro-Wilk). For dentin permeability, the data distribution was normal, and then subjected to two-way (desensitizing agent and evaluation time) repeated measures ANOVA and Tukey's *post-hoc* test ($\alpha=0.05$). For cytotoxicity (Alamar Blue and Protein Quantification) the data distribution was not normal and subjected to Kruskal-Wallis and Newman-Keuls *post-hoc* test ($\alpha=0.05$).

3. RESULTS

3.1. Dentin permeability

ANOVA showed (Table 2) that between the two study factors analyzed, there was statistically significant difference for both, desensitizing agents ($p=0.0133$) and evaluation time (<0.0001). The interaction between the factors was not statistically significant ($p=0.2647$).

In the comparison among the desensitizing agents (Table 3), it can be observed that the highest values of dentin permeability were found for the control group, in the initial (0.277 ± 0.120 Lp), after treatment (0.131 ± 0.076 Lp) and after cycling (0.044 ± 0.014 Lp) measurements. There was no statistically significant difference among all groups in the initial time ($p>0.05$). After treatment, the control group presented the highest value of dentin permeability (0.131 ± 0.076 Lp) with significant difference to the other groups ($p<0.05$). And after acid challenge, the highest value was also found for control group (0.044 ± 0.014 Lp) with no difference to Desensibilize Nano P group (0.037 ± 0.019 Lp) ($p=0.2502$).

In comparison among the evaluation times (initial, after treatment and after acid challenge), all the desensitizing agents showed higher values of dentin permeability initially, with significant difference compared to other times ($p < 0.05$). There was no statistically significant difference between after treatment and after acid challenge time points ($p > 0.05$).

The EDS results in control and experimental groups regarding calcium (Ca %wt) and phosphorus (P %wt) are shown in Table 4. In general, the calcium and phosphorus chemical elements increased after treatments and decreased after acid challenge. The representative photomicrographs of each experimental group are displayed in Figures 3, 4 and 5.

3.2. Cytotoxicity – Alamar Blue

According to the results, there were no significant differences among the experimental groups in relation to cytotoxicity by the Alamar Blue test ($p > 0.05$, Table 5). The majority of the groups exhibited higher values of cell mortality percentage in the first 15 minutes treatment analysis, with no significant difference with 24 and 48 hours ($p > 0.05$, Table 5).

3.3. Protein Quantification by BCA Method

According to the results presented in Table 6, there were no significant differences in the total protein concentrations among the evaluation times (15 minutes, 24 hours, and 48 hours) ($p > 0.05$).

In the comparison among the treatments, the lowest values of protein concentration were found for the Desensibilize Nano P in all evaluation times; however, with no significant difference for the other products after the first 15 minutes application ($p > 0.05$). In the 24 hours evaluation time, the Desensibilize Nano P group showed a

higher decrease in the total protein concentration (0.009 ± 0.008 mg/ml), with significant difference only for the T5-OH Bioactive Glass (0.067 ± 0.035 mg/ml) and F18 Bioactive Glass (0.052 ± 0.015 mg/ml) groups ($p < 0.05$). In the 48 hours evaluation time, the Desensibilize Nano P group showed significant difference for all the experimental groups ($p < 0.05$), except for the controls (only cells and distilled water; $p > 0.05$).

4. DISCUSSION

The clinical interventions for dentin hypersensitivity are the prevention and removal of pain origin [35]. Desensitizing products are used to promote dentinal tubule obliteration and inhibition of nerve activity [19,35]. Therefore, the success of long-term treatment depends on the ability of obliterating and diffusing into dentinal tubules to resist erosion and abrasion [35,40]. In addition, the application of these products present a notable potential toxicity when in contact with gingival (when applied to the cervical area of a hypersensitive tooth) or pulpal (by advancing from open dentinal tubules into the pulp) tissues [35,41]. Professional desensitizing products include chemical agents which can have their effects reduced over time, and studies have shown that many of them contain several cytotoxic components, such as sodium fluoride [35,41-44]. Desensitizing bioactive materials have been studied due to their possible ability to react with body fluids depositing hydroxycarbonate apatite within demineralized collagen fibrils, occluding dentinal tubules [45,46]. In a study realized by Jung et al. (2019) investigating the effects of a bioactive glass incorporated into a resin composite, the results showed that it effectively occluded the dentinal tubule, formed a membrane-like layer, was stable after acid challenge and presented no cytotoxicity [47]. This partially corroborates with the present study in which, in general, the bioactive glasses reduced dentin permeability, presented acid-stability (Table 3) but demonstrated cytotoxicity (Table 5). Thus, the first null hypothesis of the study was rejected and the second, accepted.

Studies using bioactive glasses as a method of dentin hypersensitivity treatment have been conducted [33,47,48]. Bioactive glasses induce remineralization through ion dissolution and osteoconductivity, which creates hydroxycarbonate apatite precipitates and mechanically occlude the tubules [33,47,49]. Quantitative measurements performed in the present study showed that after treatments, all the groups except for control, reduced the dentin permeability (Table 3). This suggests similar efficacy for tubule occlusion previously reported in the literature of desensitizing products [50,51] and experimental bioactive glasses [1,47]. Results of the qualitative measurements (EDS and SEM) confirmed that this might be due to the similar amount of minerals (calcium and phosphorous) that all the groups were able to deposit on the dentin surface (Table 4 and Figure 5). In the EDS analysis, the F18 Bioactive Glass was the only material that presented less minerals after treatment and after acid challenge. It is speculated that it might have formed a very thick layer of the material on dentin surface, preventing proper detection of minerals.

Acid-resistant stability is also a key factor in the prognosis of the dentin hypersensitivity treatment [47]. In acidic conditions, the degree of mineralization of peritubular dentin is larger than intertubular dentin, increasing the size of the dentinal tubules (Figures 4 and 6) [47,52]. The literature has shown that the application of desensitizers associated with maintenance therapy might be likely to provide tubule closure for up to six months [53,54]. In this study, when comparing the evaluation times “after treatment” and “after acid challenge”, all the groups presented acid-resistance stability (Table 3). Similar results were described by Jung et al. (2019) and Garofalo et al. (2019), when evaluating the effects of desensitizing products on dentin tubule occlusion and erosive wear [47,55]. When comparing the groups (products) after acid challenge, the dentin permeability showed significant increase only for control and

Desensibilize Nano P groups (Table 3), which means more long-term instability of the product and also corroborates with the literature [55-58]. This might have occurred because of its low viscosity, thus resulting in a thinner layer over the dentin surface [55]. Possibly, more applications could result in more effective occlusion.

The cytotoxicity of the desensitizing products to the pulpal and gingival tissues is a significant concern and their biocompatibility has been the subject of different in vitro cytotoxicity studies [35,59-63]. For this purpose, primary human gingival fibroblast cells have been widely used [35,40,44,59,60,64-66]. It has been reported that, because of their specific metabolic activities, primary cell lines are more suitable for in vivo conditions [35,67]. In the present study, the cytotoxicity of the desensitizing products on gingival fibroblasts was evaluated by Alamar Blue assay. The quantification of total protein by BCA method was further assessed.

According to the results obtained in this study, when the different desensitizing products were tested on gingival fibroblast cells, all of them presented similar cytotoxicity in all the evaluation times, with no significant differences for the Alamar Blue assay (Table 5). It is known that the toxicity of a material is related to its composition [35,41-43]. Even though the ideal result would be for the tested materials not to present cytotoxicity, the bioactive glasses offered the same safety for use as the products that are already commercially approved. It is also important to note that applying the products directly on the cells is an overstated simulation of the clinical reality. These results corroborate with the ones described in a research comparing 12 different professional desensitizing products (including Ultra EZ) in terms of cytotoxicity to gingival fibroblasts by applying the 3-(4,5- dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay [35]. Regarding the bioactive glasses, the current results diverge from the literature,

in which a research found that a bioactive glass paste used for treatment of dentin hypersensitivity presented higher biocompatibility to dental pulp cells [40].

Especially in relation to biopharmaceutical compounds, it is of great importance to obtain an accurate measurement of protein concentration to investigate cytotoxicity and functionality [68]. The total release of proteins into the culture supernatant can provide information on the overall cell physiology and an estimate of productivity [68]. Thus, normal protein expression can be a marker of cell biocompatibility. In this study, the secretion of dentin proteins by gingival fibroblast cells was homogenous among the wells and not affected by the desensitizing products, irrespective of the evaluation times; reinforcing the results found by Alamar Blue assay. The group of cells treated with Desensibilize Nano P was not statistically different but presented the lowest means of total protein concentrations, suggesting greater detachment of the cells, and therefore, modified metabolic activity. This finding may be related to the ingredients of this material [35], but also to the time of application used in the present study (15 minutes), once manufacturers recommend applying it on the tooth surface for five minutes in clinical practice. In the 24 and 48 hours timepoints, the bioactive glasses presented higher total protein concentrations ($p < 0.05$), which again suggests higher metabolic activity. However, since in the present study the Alamar Blue assay showed low metabolic activity and the Protein assay showed varied levels of protein concentrations at some points, it can be suggested that the cells may have become healthier, producing more protein. Results found by Lopez et al. (2017) and Malavasi (2019) indicate that bioactive glasses present good interaction with cells, related specifically to the proteins adsorption on their surface and to their ionic dissolution products, increasing cell growth and producing intense mineral matrix deposition [69,70].

In the current study, some aspects might be considered as limiting factors, such as the clinical buffering capacity of dentin and saliva [35,71]. Also, the pulpal pressure and clearance were not simulated. Future studies are still necessary to assess clinical performance of bioglass-based desensitizers and define possible protocols of use which would result in direct benefit for patients regarding dentin hypersensitivity.

5. CONCLUSION

Considering the limitations of the present *in vitro* experiment, it was concluded that the application of a bioglass-based dentin desensitizer might be likely to provide a satisfactory closure of the tubules with minerals particles presenting similar efficacy to commercialized products.

REFERENCES

- [1] Ma, Q. Wang, T. Meng, Q. Xu, X. Wu, H. Xu, D. Chen, Y. Comparison of *in vitro* dentinal tubule occluding efficacy of two different methods using a nano-scaled bioactive glass-containing desensitizing agent, J. Dent. 60 (2017) 63-69. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2017.03.001>.
- [2] Orchardson, R. Gillam, D.G. Managing dentin hypersensitivity, J. Am. Dent. Assoc. 137 (2006) 990-998. <https://doi.org/10.14219/jada.archive.2006.0321>.
- [3] Brännstrom, M. Linden, L.A. Johnson, G. Movement of dentinal and pulpal fluid caused by clinical procedures, J. Dent. Res. 47 (1968) 679-682. <https://doi.org/10.1177/00220345680470050201>.
- [4] Morris, M.F. Davis, R.D. Richardson, B.W. Clinical efficacy of two dentin desensitizing agents, Am. J. Dent. 12 (1999) 72-76.

- [5] Gillam, D.G. Newman, H.N. Davies, E.H. Bulman, J.S. Troullos, F.A. Clinical evaluation of ferric oxalate in relieving dentine hypersensitivity, *J. Oral. Rehabil.* 31 (2004) 245-250. <https://doi.org/10.1046/j.0305-182X.2003.01230.x>.
- [6] Pillon, F.L. Romani, I.F. Schmidt, E.R. Effect of a 3% potassium oxalate topical application on dentinal hypersensitivity after subgingival scaling and root planing, *J. Periodontol.* 75 (2004) 1461-1464. <https://doi.org/10.1902/jop.2004.75.11.1461>.
- [7] Markowitz, K. Pashley, D.H. Personal reflections on a sensitive subject. *J. Dent. Res.* 86 (2007) 292-295.
- [8] Davies, M. Paice, E.M. Jones, S.B. Leary, S. Curtis, A.R. West, N.X. Efficacy of desensitizing dentifrices to occlude dentinal tubules, *Eur. J. Oral. Sci.* 119 (2011) 497-503. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0722.2011.00872.x>.
- [9] Lynch, E. Brauer, D.S. Karpukhina, N. Gillam, D.G. Hill, R.G. Multi-component bioactive glasses of varying fluoride content for treating dentin hypersensitivity, *Dent. Mater.* 28 (2012) 168-178. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2011.11.021>.
- [10] Wang, T.D. Yang, S. Wang, L. Feng, H.L. Use of poly (amidoamine) dendrimer for dentinal tubule occlusion: a preliminary study, *PLoS. One.* 10 (2015) e0124735. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0124735>.
- [11] Ning, T.Y. Xu, X.H. Zhu, L.F. Zhu, X.P. Chu, C.H. Liu, L.K. Li, Q.L. Biomimetic mineralization of dentin induced by agarose gel loaded with calcium phosphate, *J. Biomed. Mater. Res. B. Appl. Biomater.* 100 (2012) 138-144. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.31931>.
- [12] Gillam, D. Chesters, R. Attril, D. Brunton, P. Slater, M. Strand, P. Whelton, H. Bartlett, D. Dentine hypersensitivity-guidelines for management of a common oral health problem, *Dent. Update.* 40 (2013) 514-516, 518-520, 523-524. <https://10.12968/denu.2013.40.7.514>.

- [13] Thanatvarakorn, O. Nakashima, S. Sadr, A. Prasansutti-porn, T. Ikeda, M. Tagami, J. In vitro evaluation of dentinal hydraulic conductance and tubule sealing by a novel calcium phosphate desensitizer, J. Biomed. Mater. Res. B. Appl. Biomater. 101 (2013) 303-309. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.32840>.
- [14] Lochaiwatana, Y. Poolthong, S. Hirata, I. Okasaki, M. Swasdison, S. Vongsavan, N. The synthesis and characterization of a novel potassium chloride-fluoridated hydroxyapatite varnish for treating dentin hypersensitivity, Dent. Mater. J. 34 (2015) 31-40. <https://doi.org/10.4012/dmj.2014-102>.
- [15] Varoni, E.M. Zuccheri, T. Carletta, A. Palazzo, B. Cochis, A. Colonna, M. Rimondini, L. In vitro efficacy of a novel potassium oxalate hydrogel for dentin hypersensitivity, Eur. J. Oral. Sci. 125 (2017) 151-159. <https://doi.org/10.1111/eos.12334>.
- [16] João-Souza, S.H. Machado, A.C. Lopes, R.M. Zazell, D.M. Scaramucci, T. Aranha, A.C.C. Effectiveness and acid/tooth brushing resistance of in-office desensitizing treatments - A hydraulic conductance study, Arch. Oral. Biol. 96 (2018) 130-136. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2018.09.004>.
- [17] Miglani, S. Aggarwal, V. Ahuja, B. Dentin hypersensitivity: recent trends in management, J. Conserv. Dent. 13 (2010) 218-224. <https://doi.org/10.4103/0972-0707.73385>.
- [18] Chu, C.H. Lam, A. Lo, E.C.M. Dentin hypersensitivity and its management, Gen. Dent. 59 (2011) 115-122; quiz 123-124.
- [19] Porto, I.C. Andrade, A.K. Montes, M.A. Diagnosis and treatment of dentinal hypersensitivity, J. Oral. Sci. 51 (2009) 323-332. <https://doi.org/10.2334/josnusd.51.323>.
- [20] Bamise, C.T. Esan, T.A. Mechanisms and treatment approaches of dentine hypersensitivity: a literature review, Oral. Health. Prev. Dent. 9 (2011) 353-367.

- [21] Pashley, D.H. Dentin permeability and its role in the pathobiology of dentine sensitivity, *Arch. Oral. Biol.* 39 (1994) 73S-80S. [https://doi.org/10.1016/0003-9969\(94\)90191-0](https://doi.org/10.1016/0003-9969(94)90191-0).
- [22] Yu, X. Liang, B. Jin, X. Fu, B. Hanning, M. Comparative in vivo study on the desensitizing efficacy of dentin desensitizers and one-bottle self-etching adhesives, *Oper. Dent.* 35 (2010) 279-286. <https://doi.org/10.2341/09-346-C>.
- [23] Prati, C. Venturi, L. Valdrè, G. Mongiorgi, R. Dentin morphology and permeability after brushing with different tooth-pastes in the presence and absence of smear layer, *J. Periodontol.* 73 (2002) 183-190. <https://doi.org/10.1902/jop.2002.73.2.183>.
- [24] Arrais, C.A.G. Micheloni, C.D. Giannini, M. Chan, D.C. Occluding effect of dentifrices on dentinal tubules, *J. Dent.* 31 (2003) 577-584. [https://doi.org/10.1016/s0300-5712\(03\)00115-5](https://doi.org/10.1016/s0300-5712(03)00115-5).
- [25] Ferreira-Filho, R.C. Ely, C. Amaral, R.C. Rodrigues, J.A. Roulet, J.F. Cassoni, A. Reis, A.F. Effect of Different Adhesive Systems Used for Immediate Dentin Sealing on Bond Strength of a Self-Adhesive Resin Cement to Dentin, *Oper. Dent.* 43 (2018) 391-397. <https://doi.org/10.2341/17-023-L>.
- [26] Wiegand, A. Buchholz, K. Werner, C. Attin T. In vitro cytotoxicity of different desensitizers under simulated pulpal flow conditions, *J. Adhes. Dent.* 10 (2008) 227-232.
- [27] Marto, C.M. Baptista Paula, A. Nunes, T. Pimenta, M. Abrantes, A.M. Pires, A.S. Laranjo, M. Coelho, A. Donato, H. Botelho, M.F. Marques Ferreira, M. Carrilho, E. Evaluation of the efficacy of dentin hypersensitivity treatments - A systematic review and follow up analysis, *J. Oral. Rehabil.* 46 (2019) 952-990. <https://doi.org/10.1111/joor.12842>.

- [28] Bae, J.H. Kim, Y.K. Myung, S.K. Desensitizing toothpaste versus placebo for dentin hypersensitivity: a systematic review and meta-analysis, *J. Clin. Periodontol.* 42 (2015) 131-141. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12347>.
- [29] Elkassas, D. Arafa, A. Remineralizing efficacy of different calcium-phosphate and fluoride based delivery vehicles on artificial caries like enamel lesions, *J. Dent.* 42 (2014) 466-474. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2013.12.017>.
- [30] Yamazaki, H. Litman, A. Margolis, H.C. Effect of fluoride on artificial caries lesion progression and repair in human enamel: regulation of mineral deposition and dissolution under in vivo-like conditions, *Arch. Oral. Biol.* 52 (2007) 110-120. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2006.08.012>.
- [31] Nicholson, J.W. Czarnecka, B. The biocompatibility of resin modified glass-ionomer cements for dentistry, *Dent. Mater.* 24 (2008) 1702-1708. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2008.04.005>.
- [32] Rafeek, R.N. The effects of heat treatment on selected properties of a conventional and a resin-modified glass ionomer cement, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 19 (2008) 1913-1920. <https://doi.org/10.1007/s10856-007-3270-8>.
- [33] Chiang, Y.C. Chen, H.J. Liu, H.C. Kang, S.H. Lee, B.S. Lin, F.H. Lin, H.P. Lin, C.P. A novel mesoporous biomaterial for treating dentin hypersensitivity, *J. Dent. Res.* 89 (2010) 236-240. <https://doi.org/10.1177/0022034509357148>.
- [34] Sun, L. Chow, L.C. Frukhtbeyn, S.A. Bonevich, J.E. Preparation and properties of nanoparticles of calcium phosphates with various Ca/P ratios, *J. Res. Natl. Inst. Stand. Technol.* 115 (2010) 243-255. <https://doi.org/10.6028/jres.115.018>.
- [35] Pintado-Palomino, K. Peiti Filho, O. Zanolto, E.D. Tirapelli, C. A clinical, randomized, controlled study on the use of desensitizing agents during tooth bleaching, *J. Dent.* 43 (2015) 1099-1105. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2015.07.002>.

- [36] Canali, G.D. Rached, R.N. Mazur, R.F. Souza, E.M. Effect of Erosion/Abrasion Challenge on the Dentin Tubule Occlusion Using Different Desensitizing Agents, *Braz. Dent. J.* 28 (2017) 216-224. <https://doi.org/10.1590/0103-6440201700811>.
- [37] Eyüboğlu, G.B. Yesilyurt, C. Ertürk, M. Evaluation of Cytotoxicity of Dentin Desensitizing Products, *Oper. Dent.* 40 (2015) 503-514. <https://doi.org/10.2341/13-334-L>.
- [38] Stavroullakis, A. Brito, C. Chen, H.Y. Bajenova, E. Prakki, A. Nogueira-Filho, G. Dental Implant surface treatments may modulate cytokine secretion in *Porphyromonas gingivallis*-stimulated human gingival fibroblasts: a comparative study, *J. Biomed. Mater. Res. A.* 103 (2015) 1131-1140. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.35262>.
- [39] Ahmed, S.A. Gogal, R.M. Jr. Walsh, J.E. A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes: an alternative to [³H] thymidine incorporation assay, *J. Immunol. Methods.* 170 (1994) 211-224. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(94\)90396-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(94)90396-4).
- [40] 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, *J. Endod.* 33 (2007) 451-454. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2006.12.014>.
- [41] Huang, F.M. Chang, Y.C. Cytotoxicity of dentine-bonding agents on human pulp cells treated with inorganic fluorides, *Int. Endod. J.* 35 (2002) 905-909. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2591.2002.00589.x>.
- [42] Chang, H.H. Guo, M.K. Kasten, F.H. Chang, M.C. Huang, G.F. Wang, Y.L. Jeng, J.H. Stimulation of glutathione depletion, ROS production and cell cycle arrest of dental pulp cells and gingival epithelial cells by HEMA, *Biomaterials.* 26 (2005) 745-753. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2004.03.021>.

- [43] Khalil, A.M. Chromosome aberrations in cultured rat bone marrow cells treated with inorganic fluorides, *Mutat. Res.* 343 (1995) 67-74. [https://doi.org/10.1016/0165-1218\(95\)90063-2](https://doi.org/10.1016/0165-1218(95)90063-2).
- [44] Geurtsen, W. Lehmann, F. Spahl, W. Leyhausen, G. Cytotoxicity of 35 dental resin composite monomers/additives in permanent 3T3 and three human primary fibroblast cultures, *J. Biomed. Mater. Res.* 41 (1998) 474-480. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-4636\(19980905\)41:3<474::aid-jbm18>3.0.co;2-i](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-4636(19980905)41:3<474::aid-jbm18>3.0.co;2-i).
- [45] Sauro, S. Thompson, I. Watson, T.F. Effects of common dental materials used in preventive and operative dentistry on dentin permeability and remineralization, *Oper. Dent.* 36 (2011) 222-230. <https://doi.org/10.2341/10-225-L>.
- [46] Forsback, A.P. Areva, S. Salonen, J.I. Mineralization of dentin induced by treatment with bioactive glass S53P4 in vitro, *Acta. Odontol. Scand.* 62 (2004) 14-20. <https://doi.org/10.1080/00016350310008012>.
- [47] Jung, J.H. Kim, D.H. Yoo, K.H. Yoon, S.Y. Kim, Y. Bae, M.K. Chung, J. Ko, C.C. Kwon, Y.H. Kim, Y.I. Dentin sealing and antibacterial effects of silver-doped bioactive glass/mesoporous silica nanocomposite: an in vitro study, *Clin. Oral. Investig.* 23 (2019) 253-266. <https://doi.org/10.1007/s00784-018-2432-z>.
- [48] Lee, B.S. Chang, C.W. Chen, W.P. Lan, W.H. Lin, C.P. In vitro study of dentin hypersensitivity treated by Nd:YAP laser and bioglass, *Dent. Mater.* 21 (2005) 511-519. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2004.08.002>.
- [49] Tian, L. Peng, C. Shi, Y. Guo, X. Zhong, B. Qi, J. Wang, G. Cai, Q. Cui, F. Effect of mesoporous silica nanoparticles on dentinal tubule occlusion: an in vitro study using SEM and image analysis, *Dent. Mater. J.* 33 (2014) 125-132. <https://doi.org/10.4012/dmj.2013-215>.

- [50] Duran, I. Sengun, A. Hadimli, H.H. Ulker, M. Evaluation of Antibacterial Effectiveness of Desensitizers against Oral Bacteria, *Eur. J. Dent.* 2 (2008) 43-47.
- [51] Wang, L. Magalhães, A.C. Francisconi-Dos-Rios, L.F. Calabria, M.P. Araújo, D. Buzalaf, M. Lauris, J. Pereira, J.C. Treatment of Dentin Hypersensitivity Using Nano-Hydroxyapatite Pastes: A Randomized Three-Month Clinical Trial, *Oper. Dent.* 41 (2016) E93-E101. <https://doi.org/10.2341/15-145-C>.
- [51] Reis, C. De-Deus, G. Leal, F. Azevedo, E. Coutinho-Filho, T. Paciornik, S. Strong effect on dentin after the use of high concentrations of citric acid: an assessment with co-site optical microscopy and ESEM, *Dent. Mater.* 24 (2008) 1608-1615. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2008.03.027>.
- [52] Galvão, A.D.M. Zeola, L.F. Moura, G.F. Teixeira, D. Gonzaga, R. da Silva, G.R. Soares, P.V. A long-term evaluation of experimental potassium oxalate concentrations on dentin hypersensitivity reduction: A triple-blind randomized clinical trial, *J. Dent.* 89 (2019) 103180. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2019.103180>.
- [53] Manz, A.S. Attin, T. Sener, B. Sahrman, P. Dentin tubule obturation of a bioglass-based dentin desensitizer under repeated exposure to lactic acid and brushing, *BMC. Oral Health.* 19 (2019) 274. <https://doi.org/10.1186/s12903-019-0962-7>.
- [54] Garofalo, S.A. Sakae, L.O. Machado, A.C. Cunha, S.R. Zezell, D.M. Scaramucci, T. Aranha, A.C. In vitro Effect of Innovative Desensitizing Agents on Dentin Tubule Occlusion and Erosive Wear, *Oper. Dent.* 44 (2019) 168-177. <https://doi.org/10.2341/17-284-L>.
- [55] Comar, L.P. Souza, B.M. Gracindo, L.F. Buzalaf, M.A. Magalhães, A.C. Impact of experimental nano-HAP pastes on bovine enamel and dentin submitted to a pH cycling model, *Braz. Dent. J.* 24 (2013) 273-278. <https://doi.org/10.1590/0103-6440201302175>.

- [56] Santos, L.F. Torres, C.R. Caneppele, T.M. Magalhães, A.C. Borges, A.B. Effect of home-bleaching gels modified by calcium and/or fluoride and the application of nano-hydroxyapatite paste on in vitro enamel erosion susceptibility, *Acta. Odontol. Scand.* 74 (2016) 121-126. <https://doi.org/10.3109/00016357.2015.1053150>.
- [57] Machado, A.C. Rabelo, F.E.M. Maximiniano, V. Lopes, R.M. Aranha, A.C.C. Scaramucci, T. Effect of in-office desensitizers containing calcium and phosphate on dentin permeability and tubule occlusion, *J. Dent.* 86 (2019) 53-59. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2019.05.025>.
- [58] Hoang-Dao, B.T. Hoang-Tu, H. Tran-Hung, L. Camps, J. Koubi, G. About, I. Evaluation of a natural resin-based new material (Shellac F) as a potential desensitizing agent, *Dent. Mater.* 24 (2008) 1001-1007. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2007.11.014>.
- [59] Sengun, A. Buyukbas, S. Hakky, S.S. Cytotoxic effects of dental desensitizers on human gingival fibroblasts, *J. Biomed. Mater. Res. B. Appl. Biomater.* 78 (2006) 131-137. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.30464>.
- [60] Aparna, S. Setty, S. Thakur, S. Comparative efficacy of two treatment modalities for dentinal hypersensitivity: A clinical trial, *Indian. J. Dent. Res.* 21 (2010) 544-548. <https://doi.org/10.4103/0970-9290.74213>.
- [61] Schmalz, G. Schuster, U. Koch, A. Schweikl, H. Cytotoxicity of low pH dentin-bonding agents in a dentin barrier test in vitro, *J. Endod.* 28 (2002) 188-192. <https://doi.org/10.1097/00004770-200203000-00011>.
- [62] Hanks, C.T. Wataha, J.C. Sun, Z. In vitro models of biocompatibility: A review, *Dent. Mater.* 12 (1996) 186-193. [https://doi.org/10.1016/s0109-5641\(96\)80020-0](https://doi.org/10.1016/s0109-5641(96)80020-0).
- [63] Camps, J. About, I. Van Meerbeek, B. Franquin, J.C. Efficiency and cytotoxicity of resin-based desensitizing agents, *Am. J. Dent.* 15 (2002) 300-304.

- [64] Thonemann, B. Schmalz, G. Hiller, K.A. Schweikl, H. Responses of L929 mouse fibroblasts, primary and immortalized bovine dental papilla-derived cell lines to dental resin components, *Dent. Mater.* 18 (2002) 318-323. [https://doi.org/10.1016/s0109-5641\(01\)00056-2](https://doi.org/10.1016/s0109-5641(01)00056-2).
- [65] Schmalz, G. Agar overlay method, *Int. Endod. J.* 21 (1988) 59-66. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2591.1988.tb00956.x>.
- [66] Arenholt-Bindslev, D. Bleeg, H. Characterization of two types of human oral fibroblast with a potential application to cellular toxicity studies: Tooth pulp fibroblasts and buccal mucosa fibroblasts, *Int. Endod. J.* 23 (1990) 84-91. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2591.1990.tb00844.x>.
- [67] Reichelt, W.N. Waldschitz, D. Herwig, C. Neutsch, L. Bioprocess monitoring: minimizing sample matrix effects for total protein quantification with bicinchoninic acid assay, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 43 (2016) 1271-1280. <https://doi.org/10.1007/s10295-016-1796-9>.
- [68] Lopez, T.C. Diniz, I.M. Ferreira, L.S. Marchi, J. Borges, R. de Cara, S.P. D’Almeida-Couto, R. Marques, M.M. Bioactive glass plus laser phototherapy as promise candidates for dentine hypersensitivity treatment, *J. Biomed. Mater. Res. B. Appl. Biomater.* 105 (2017) 107-116. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.33532>.
- [69] Malavasi, G. Salvatori, R. Zambon, A. Lusvardi, G. Rigamonti, L. Chiatini, L. Anesi A. Cytocompatibility of Potential Bioactive Cerium-Doped Glasses based on 45S5, *Materials (Basel)* 12 (2019) 594. <https://doi.org/10.3390/ma12040594>.
- [70] Dowd, F.J. Saliva and dental caries, *Dent. Clin. North. Am.* 43 (1999) 579-597.
- [71] Camps, J. Pashley, D.H. Buffering action of human dentin in vitro, *J. Adhes. Dent.* 2 (2000) 39-50.

FIGURAS

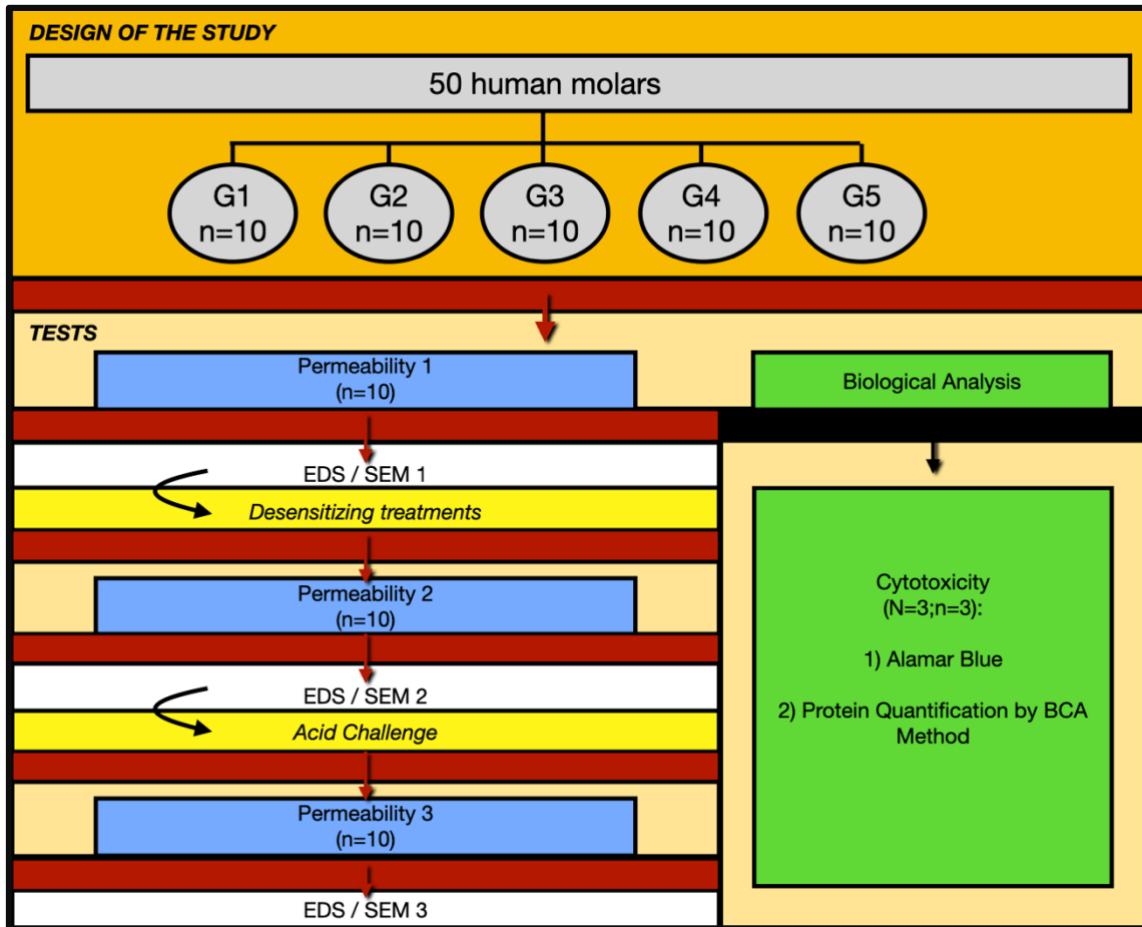


Figure 1: Design of the study.

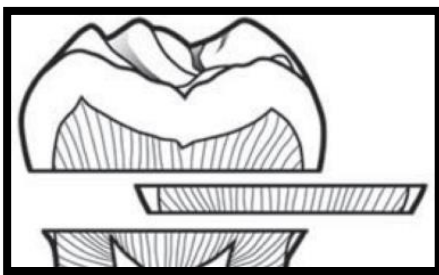


Figure 2: Section of the dentin cut.

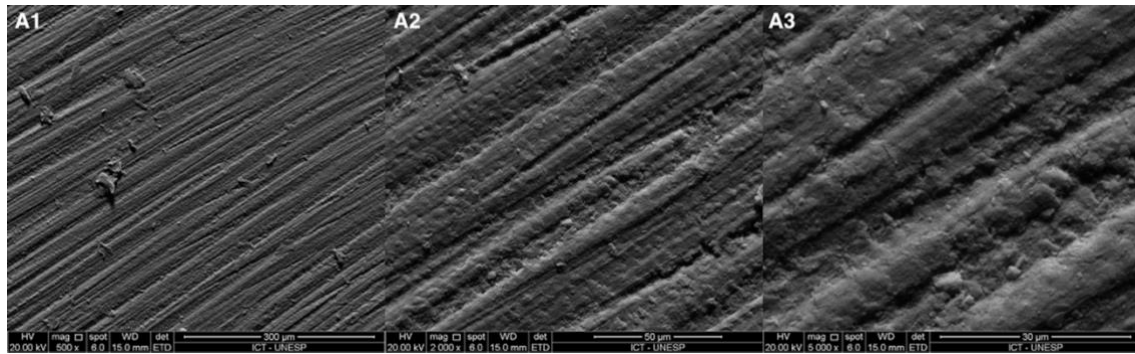


Figure 3: Representative scanning electron microscopy micrograph (A1: 500X, A2: 2000X, A3: 5000X) of a dentin before surface treatment. The images show dentin with little exposure of dentinal tubules and smear layer.

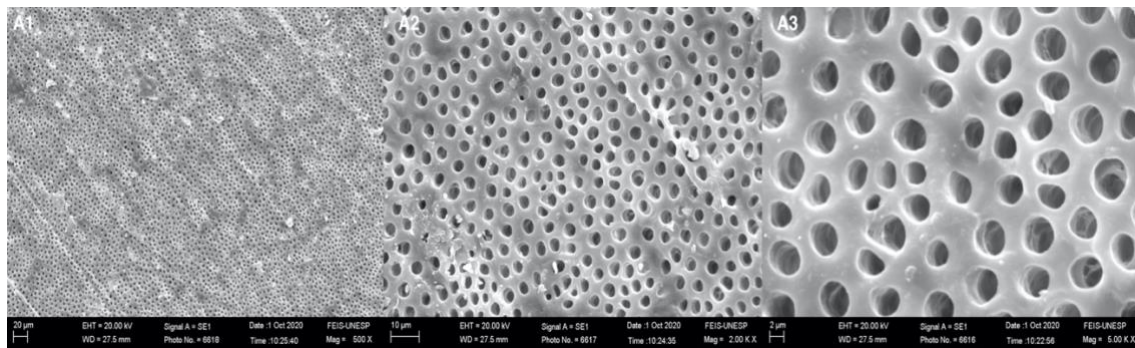


Figure 4: Representative scanning electron microscopy micrograph (A1: 500X, A2: 2000X, A3: 5000X) of a dentin after the preparation for the dentin permeability analysis using 17% EDTA. The images show dentin with great exposure of dentinal tubules and little smear layer.

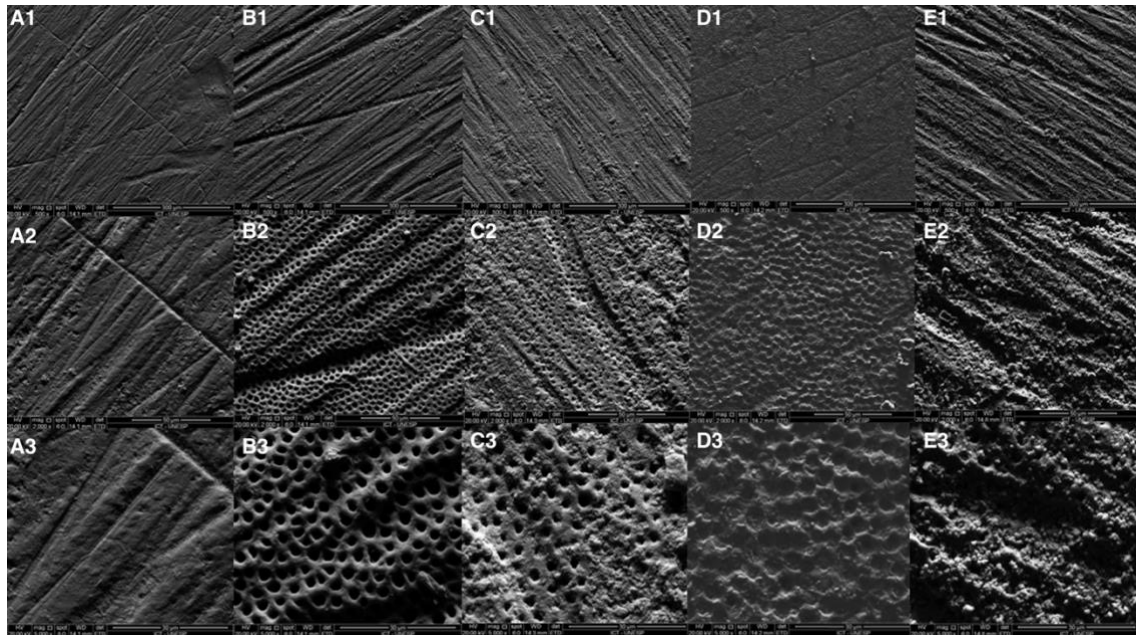


Figure 5: Representative scanning electron microscopy micrographs (1: 500X, 2: 2000X, 3: 5000X) of dentin after treatments (A: control, B: Ultra EZ, C: Desensibilize Nano P, D: T5-OH Bioactive Glass, E: F18 Bioactive Glass). Little exposure and smear layer were observed in the dentinal tubules on the images of control group (A1-3). The images from Ultra EZ group (B1-3) show dentinal tubules that are not occluded. On the image from Desensibilize Nano P group (C1-3), the dentinal tubules are partially occluded, and particles were scattered. T5-OH Bioactive Glass group (D1-3) shows dentinal tubules completely occluded with uniform appearance. And F18 Bioactive Glass group (E1-3) also presented completely occluded dentinal tubules but with mineral clusters over the surface.

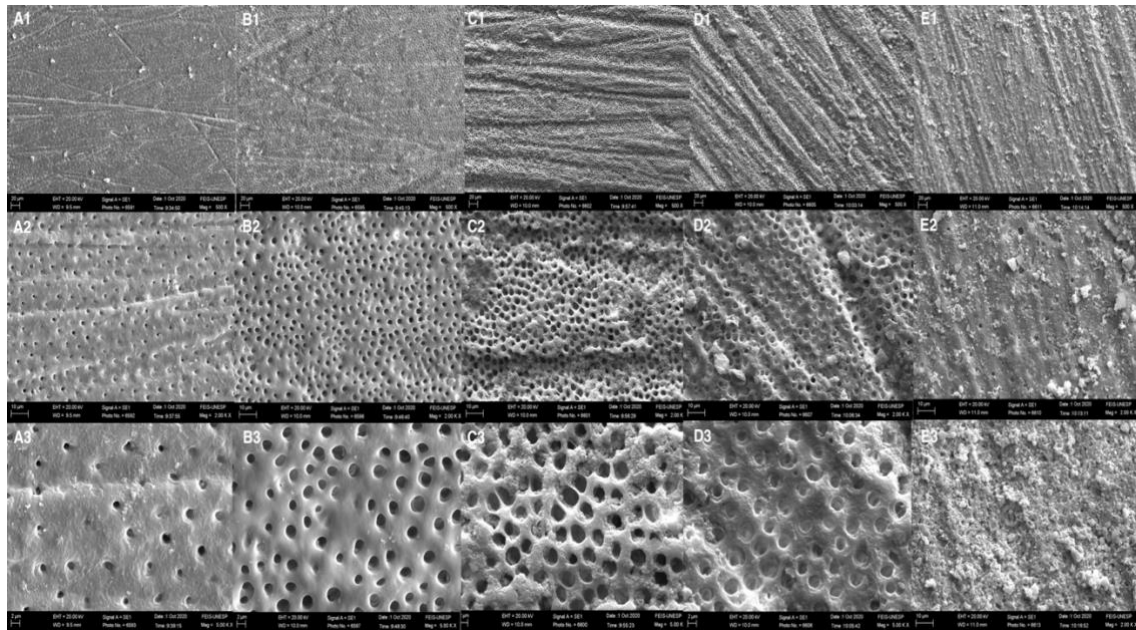


Figure 6: Representative scanning electron microscopy micrographs (1: 500X, 2: 2000X, 3: 5000X) of a dentin block after acid challenge (A: control, B: Ultra EZ, C: Desensibilize Nano P, D: T5-OH Bioactive Glass, E: F18 Bioactive Glass). Little exposure and smear layer were observed in the dentinal tubules on the images of control group (A1-3). The images from Ultra EZ group (B1-3) show dentinal tubules that are not occluded. On the image from Desensibilize Nano P group (C1-3), the dentinal tubules are partially occluded, and particles were scattered. T5-OH Bioactive Glass group (D1-3) shows dentinal tubules occluded with uniform appearance. And F18 Bioactive Glass group (E1-3) also presented completely occluded dentinal tubules but with mineral clusters over the surface.

TABELAS

Table 1. Description of the composition, manufacturers, and application protocols of selected products.

Treatment	Composition	Manufacturer	Protocol of application
Control (artificial saliva)	CaCl ₂ .2H ₂ O, 0.167g; KH ₂ PO ₄ , 0.123g; KCl, 11.2g; (HOCH ₂) ₃ CHN ₂ , 2.42g; distilled water; pH 7	Apothicário, Araçatuba, São Paulo, Brazil	Immersion of samples in 1 mL solution for 15 minutes; 1× a day during 15 consecutive days.
Ultra EZ	Potassium nitrate (3%), fluoride (0.11%)	Ultradent, South Jordan, Utah, United States	Active application of the product using a microbrush; product remained on sample for 15 minutes; removal of excesses with cotton ball; 1× a day during 15 consecutive days.
Desensibilize Nano P	Nanometric calcium phosphate (as hydroxyapatite), sodium fluoride (approximately 2%), potassium nitrate 5%.	FGM, Joinville, Santa Catarina, Brazil	
T5-OH Bioactive Glass diluted in distilled water (10%) ³⁶	Microparticles of T5-OH Bioactive Glass 10% (1- 10µm)	Vitrovita, São Carlos, São Paulo, Brazil	
F18 Bioactive Glass diluted in distilled water (10%) ³⁶	Na ₂ CO ₃ , K ₂ CO ₃ , K ₂ HPO ₄ , Na ₂ HPO ₄ , CaCO ₃ , SiO ₂ , Al ₂ O ₃ , ZnO, SrCO ₃ , B ₂ O ₃ .	Vitrovita, São Carlos, São Paulo, Brazil	

Table 2: ANOVA table for dentin permeability measurements (Lp).

	<i>DF</i>	<i>Sum of</i> <i>Squares</i>	<i>Mean</i> <i>Square</i>	<i>F Value</i>	<i>p Value</i>	<i>Lambda</i>	<i>Power</i>
<i>Groups</i>	4	.079	.020	3.552	.0133	14.209	.835
<i>Subject (Group)</i>	45	.251	.006				
<i>Category for Lp</i>	2	1.381	.690	127.479	<.0001	254.958	1.000
<i>Category for Lp * Groups</i>	8	.055	.007	1.278	.2647	10.228	.551
<i>Category for Lp * Subject (Group)</i>	90	.487	.005				

Table 3: Dentin permeability measurements (Lp; mean $\pm$ s.d.) of the different desensitizing agents, before and after treatments, and after acid challenge.

Group	Evaluation Time		
	<i>Initial</i>	<i>After Treatment</i>	<i>After Acid Challenge</i>
<i>Control</i>	0.277 $\pm$ 0.120 Ab	0.131 $\pm$ 0.076 Ba	0.044 $\pm$ 0.014 Ba
<i>Ultra EZ</i>	0.253 $\pm$ 0.121 Ab	0.056 $\pm$ 0.052 Aa	0.028 $\pm$ 0.009 Aa
<i>Desensibilize Nano P</i>	0.196 $\pm$ 0.078 Ab	0.024 $\pm$ 0.005 Aa	0.037 $\pm$ 0.019 ABa
<i>T5-OH Bioactive Glass</i>	0.254 $\pm$ 0.099 Ab	0.019 $\pm$ 0.011 Aa	0.029 $\pm$ 0.018 Aa
<i>F18 Bioactive Glass</i>	0.238 $\pm$ 0.166 Ab	0.012 $\pm$ 0.012 Aa	0.027 $\pm$ 0.006 Aa

Means followed by distinct letters, upper case in column and lower case in line, differ statistically from each other ($p < 0.05$); s.d.: standard deviation.

Table 4: Results of energy dispersive X-ray analysis (EDS) measurements (control group) in weight per cent (%wt).

Group	Evaluation Time					
	<i>Initial</i>		<i>After Treatment</i>		<i>After Acid Challenge</i>	
	<i>Ca</i>	<i>P</i>	<i>Ca</i>	<i>P</i>	<i>Ca</i>	<i>P</i>
<i>Control</i>	20.73	6.67	26.75	9.67	0.47	0.10
<i>Ultra EZ</i>	21.15	7.42	23.65	9.23	12.49	4.55
<i>Desensibilize Nano P</i>	22.72	8.51	25.76	10.13	2.33	0.93
<i>T5-OH Bioactive Glass</i>	24.96	8.38	27.81	8.99	3.97	1.57
<i>F18 Bioactive Glass</i>	22.35	6.79	18.81	6.74	1.21	0.35

Ca – calcium; P – phosphorus.

Table 5: Cytotoxicity of products (expressed by means of mortality percentages $\pm$ s.d.) to gingival fibroblasts within different evaluation times.

Group	Evaluation Time		
	<i>15 minutes</i>	<i>24 hours</i>	<i>48 hours</i>
<i>Ultra EZ</i>	82 $\pm$ 4 Aa	70 $\pm$ 7 Aa	80 $\pm$ 8 Aa
<i>Desensibilize Nano P</i>	91 $\pm$ 2 Aa	87 $\pm$ 1 Aa	87 $\pm$ 5 Aa
<i>T5-OH Bioactive</i>	90 $\pm$ 5 Aa	91 $\pm$ 5 Aa	79 $\pm$ 10 Aa
<i>Glass</i>			
<i>F18 Bioactive Glass</i>	86 $\pm$ 11 Aa	76 $\pm$ 9 Aa	81 $\pm$ 18 Aa

Means followed by distinct letters, upper case in column and lower case in line, differ statistically from each other ($p < 0.05$); s.d.: standard deviation.

Table 6: Average ($\pm$ s.d.) total protein concentrations (mg/ml) within different evaluation times.

Group	Evaluation Time		
	<i>15 minutes</i>	<i>24 hours</i>	<i>48 hours</i>
<i>Only cells</i>	0.024 $\pm$ 0.006 Aa	0.022 $\pm$ 0.015 Ba	0.010 $\pm$ 0.005 Ba
<i>Distilled water</i>	0.026 $\pm$ 0.008 Aa	0.013 $\pm$ 0.013 Ba	0.040 $\pm$ 0.024 ABa
<i>Ultra EZ</i>	0.030 $\pm$ 0.013 Aa	0.029 $\pm$ 0.012 ABa	0.055 $\pm$ 0.034 Aa
<i>Desensibilize Nano P</i>	0.014 $\pm$ 0.004 Aa	0.009 $\pm$ 0.008 Ba	0.009 $\pm$ 0.006 Ba
<i>T5-OH Bioactive</i>	0.028 $\pm$ 0.006 Aa	0.067 $\pm$ 0.035 Aa	0.046 $\pm$ 0.042 Aa
<i>Glass</i>			
<i>F18 Bioactive Glass</i>	0.019 $\pm$ 0.009 Aa	0.052 $\pm$ 0.015 Aa	0.048 $\pm$ 0.039 Aa

Means followed by distinct letters, upper case in column and lower case in line, differ statistically from each other ($p < 0.05$); s.d.: standard deviation.

Anexos

ANEXO A – Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP).

UNESP - FACULDADE DE
ODONTOLOGIA-CAMPUS DE
ARAÇATUBA/ UNIVERSIDADE



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Análise in vitro de propriedades mecânicas, biológicas e permeabilidade da dentina após uso de diferentes agentes dessensibilizantes

Pesquisador: Paulo Henrique dos Santos

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 83739318.4.0000.5420

Instituição Proponente: Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba - UNESP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.522.655

Apresentação do Projeto:

No presente estudo, as variáveis resposta serão: propriedades mecânicas (dureza e módulo de elasticidade) e permeabilidade da dentina, e

performance biológica dos produtos pela análise de citotoxicidade, função celular e resposta inflamatória em células tipo odontoblastos (MDPC-23).

Para o estudo das propriedades mecânicas e permeabilidade dentinária, serão analisados dois fatores experimentais: (1) agente dessensibilizante,

em 7 níveis (controle – saliva artificial, Verniz Clinpro™ White Varnish, Desensibilize NanoP®, Bioglass® 45S5, Biovidro F18, EGCG 0,5%, extrato

de Aloe vera) e (2) tempo de avaliação (antes e após desafio ácido). Para o estudo das propriedades biológicas dos agentes dessensibilizantes, será

analisado um fator experimental: (1) agente dessensibilizante, em 7 níveis (controle – saliva artificial, Verniz Clinpro™ White Varnish, Desensibilize

NanoP®, Bioglass® 45S5, Biovidro F18, EGCG 0,5%, extrato de Aloe vera). Dez discos de dentina humana serão utilizados para cada grupo.

Imagens em microscopia eletrônica de varredura ambiental (ESEM) serão utilizadas como análise qualitativa da dentina. Os três princípios básicos

da experimentação serão respeitados (repetição, aleatorização e blocagem).

Endereço: JOSE BONIFACIO 1193

Bairro: VILA MENDONÇA

CEP: 16.015-050

UF: SP

Município: ARACATUBA

Telefone: (18)3636-3200

Fax: (18)3636-3332

E-mail: andrebertoz@foa.unesp.br

Continuação do Parecer: 2.522.655

Objetivo da Pesquisa:

O objetivo do presente estudo será avaliar in vitro os efeitos da aplicação de diferentes agentes dessensibilizantes sobre dentina humana submetida a desafio ácido, em relação as propriedades mecânicas de dureza e módulo de elasticidade, permeabilidade (condutância hidráulica), e performance biológica dos produtos pela análise de citotoxicidade, função celular e resposta inflamatória em células tipo odontoblastos (MDPC-23).

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Apresenta riscos mínimos.

Benefícios:

Espera-se que com os dados que poderão ser obtidos a partir deste estudo, seja possível sugerir um protocolo clínico inovador, eficaz e duradouro, como alternativa de tratamento para a hipersensibilidade dentinária além daqueles já esclarecidos pela literatura.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

pesquisa apta para a sua realização, de acordo com a resolução 466/12 do CNS.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

todos os termos foram apresentados.

Recomendações:

não há.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Projeto apresenta-se apto para a sua realização.

Considerações Finais a critério do CEP:

Salientamos que, de acordo com a Resolução 466 CNS, de 12/12/2012 (título X, seção X.1., art. 3, item b, e, título XI, seção XI.2., item d), há necessidade de apresentação de relatórios semestrais, devendo o primeiro relatório ser enviado até 01/08/2018

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_DO_PROJETO_1068045.pdf	30/01/2018 09:52:07		Aceito

Endereço: JOSE BONIFACIO 1193
Bairro: VILA MENDONÇA CEP: 16.015-050
UF: SP Município: ARACATUBA
Telefone: (18)3636-3200 Fax: (18)3636-3332 E-mail: andrebertoz@foa.unesp.br

UNESP - FACULDADE DE
ODONTOLOGIA-CAMPUS DE
ARAÇATUBA/ UNIVERSIDADE



Continuação do Parecer: 2.522.655

TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Solicitacao_de_Dispenza_do_TCLE.pdf	30/01/2018 09:50:18	Paulo Henrique dos Santos	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Doutorado_Bruna.pdf	30/01/2018 09:35:41	Paulo Henrique dos Santos	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rostoassinada.pdf	30/01/2018 09:29:56	Paulo Henrique dos Santos	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

ARACATUBA, 02 de Março de 2018

Assinado por:
André Pinheiro de Magalhães Bertoz
(Coordenador)

Endereço: JOSE BONIFACIO 1193

Bairro: VILA MENDONÇA

CEP: 16.015-050

UF: SP

Município: ARACATUBA

Telefone: (18)3636-3200

Fax: (18)3636-3332

E-mail: andrebertoz@foa.unesp.br

ANEXO B - Normas da revista selecionada para publicação do artigo.

JOURNAL OF DENTISTRY

<https://www.elsevier.com/journals/journal-of-dentistry/0300-5712?generatepdf=true>

ANEXO C - Análises Estatísticas.

ESTATISTICA - PERMEABILIDADE

Dados apresentam distribuição normal. Foi feito two-way repeated measures ANOVA e teste de Tukey ($p < 0,05$). Os fatores foram grupos experimentais e tempo de análise (inicial, pós tratamento e pós ciclagem)

ANALISE GERAL

ANOVA Table for LP

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value	Lambda	Power
Groups	4	.079	.020	3.552	.0133	14.209	.835
Subject(Group)	45	.251	.006				
Category for LP	2	1.381	.690	127.479	<.0001	254.958	1.000
Category for LP* Groups	8	.055	.007	1.278	.2647	10.228	.551
Category for LP* Subject(Group)	90	.487	.005				

Means Table for LP

Effect: Category for LP * Groups

	Count	Mean	Std. Dev.	Std. Err.
Control, Initial	10	.277	.120	.038
Control, After treatment	10	.131	.076	.024
Control, After cycling	10	.044	.014	.004
Ultra EZ, Initial	10	.253	.121	.038
Ultra EZ, After treatment	10	.056	.052	.016
Ultra EZ, After cycling	10	.028	.009	.003
Nano P, Initial	10	.196	.078	.025
Nano P, After treatment	10	.024	.005	.002
Nano P, After cycling	10	.037	.019	.006
Bioglass T5, Initial	10	.254	.099	.031
Bioglass T5, After treatment	10	.019	.011	.003
Bioglass T5, After cycling	10	.029	.018	.006
Bioglass F18, Initial	10	.238	.166	.052
Bioglass F18, After treatment	10	.012	.012	.004
Bioglass F18, After cycling	10	.027	.006	.002

Tukey/Kramer for LP
Effect: Groups
Significance Level: 5 %

	Mean Diff.	Crit. Diff.	
Control, Ultra EZ	.039	.055	
Control, Nano P	.065	.055	S
Control, Bioglass T5	.050	.055	
Control, Bioglass F18	.058	.055	S
Ultra EZ, Nano P	.027	.055	
Ultra EZ, Bioglass T5	.011	.055	
Ultra EZ, Bioglass F18	.020	.055	
Nano P, Bioglass T5	-.015	.055	
Nano P, Bioglass F18	-.007	.055	
Bioglass T5, Bioglass F18	.008	.055	

Tukey/Kramer for LP
Effect: Category for LP
Significance Level: 5 %

	Mean Diff.	Crit. Diff.	
Initial, After treatment	.195	.035	S
Initial, After cycling	.211	.035	S
After treatment, After cycling	.015	.035	

COMPARAÇÃO ENTRE OS TEMPOS DE ANÁLISE PARA CADA GRUPO

ANOVA Table for LP
Split By: Groups
Cell: Control

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value	Lambda	Power
Subject	9	.076	.008				
Category for LP	2	.277	.138	23.130	<.0001	46.259	1.000
Category for LP * Subject	18	.108	.006				

Tukey/Kramer for LP
Effect: Category for LP
Significance Level: 5 %
Split By: Groups
Cell: Control

	Mean Diff.	Crit. Diff.	
Initial, After treatment	.146	.088	S
Initial, After cycling	.233	.088	S
After treatment, After cycling	.087	.088	

ANOVA Table for LP
Split By: Groups
Cell: Ultra EZ

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value	Lambda	Power
Subject	9	.058	.006				
Category for LP	2	.301	.150	27.650	<.0001	55.301	1.000
Category for LP * Subject	18	.098	.005				

Tukey/Kramer for LP
Effect: Category for LP
Significance Level: 5 %
Split By: Groups
Cell: Ultra EZ

	Mean Diff.	Crit. Diff.	
Initial, After treatment	.197	.084	S
Initial, After cycling	.225	.084	S
After treatment, After cycling	.027	.084	

ANOVA Table for LP
Split By: Groups
Cell: Nano P

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value	Lambda	Power
Subject	9	.017	.002				
Category for LP	2	.185	.092	40.086	<.0001	80.172	1.000
Category for LP * Subject	18	.041	.002				

Tukey/Kramer for LP
Effect: Category for LP
Significance Level: 5 %
Split By: Groups
Cell: Nano P

	Mean Diff.	Crit. Diff.	
Initial, After treatment	.173	.055	S
Initial, After cycling	.159	.055	S
After treatment, After cycling	-.013	.055	

ANOVA Table for LP
Split By: Groups
Cell: Bioglass T5

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value	Lambda	Power
Subject	9	.024	.003				
Category for LP	2	.354	.177	46.717	<.0001	93.434	1.000
Category for LP * Subject	18	.068	.004				

Tukey/Kramer for LP
Effect: Category for LP
Significance Level: 5 %
Split By: Groups
Cell: Bioglass T5

	Mean Diff.	Crit. Diff.	
Initial, After treatment	.235	.070	S
Initial, After cycling	.226	.070	S
After treatment, After cycling	-.009	.070	

ANOVA Table for LP
Split By: Groups
Cell: Bioglass F18

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value	Lambda	Power
Subject	9	.076	.008				
Category for LP	2	.319	.160	16.716	<.0001	33.432	.999
Category for LP * Subject	18	.172	.010				

Tukey/Kramer for LP
Effect: Category for LP
Significance Level: 5 %
Split By: Groups
Cell: Bioglass F18

	Mean Diff.	Crit. Diff.	
Initial, After treatment	.226	.112	S
Initial, After cycling	.211	.112	S
After treatment, After cycling	-.015	.112	

COMPARAÇÃO ENTRE OS TRATAMENTOS DENTRO DE CADA GRUPO

ANOVA Table for Initial

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value	Lambda	Power
Groups	4	.036	.009	.621	.6500	2.483	.185
Residual	45	.651	.014				

ANOVA Table for After treatment

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value	Lambda	Power
Groups	4	.097	.024	13.803	<.0001	55.213	1.000
Residual	45	.079	.002				

Tukey/Kramer for After treatment
Effect: Groups
Significance Level: 5 %

	Mean Diff.	Crit. Diff.	
Control, Ultra EZ	.076	.053	S
Control, Nano P	.108	.053	S
Control, Bioglass T5	.112	.053	S
Control, Bioglass F18	.119	.053	S
Ultra EZ, Nano P	.032	.053	
Ultra EZ, Bioglass T5	.036	.053	
Ultra EZ, Bioglass F18	.043	.053	
Nano P, Bioglass T5	.004	.053	
Nano P, Bioglass F18	.011	.053	
Bioglass T5, Bioglass F18	.007	.053	

ANOVA Table for After cycling

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value	Lambda	Power
Groups	4	.002	.001	2.740	.0401	10.959	.709
Residual	45	.009	1.991E-4				

Fisher's PLSD for After cycling

Effect: Groups

Significance Level: 5 %

	Mean Diff.	Crit. Diff.	P-Value	
Control, Ultra EZ	.016	.013	.0145	S
Control, Nano P	.007	.013	.2502	
Control, Bioglass T5	.015	.013	.0182	S
Control, Bioglass F18	.017	.013	.0090	S
Ultra EZ, Nano P	-.009	.013	.1748	
Ultra EZ, Bioglass T5	-.001	.013	.9259	
Ultra EZ, Bioglass F18	.001	.013	.8537	
Nano P, Bioglass T5	.008	.013	.2053	
Nano P, Bioglass F18	.010	.013	.1248	
Bioglass T5, Bioglass F18	.002	.013	.7816	

Tukey/Kramer for After cycling

Effect: Groups

Significance Level: 5 %

	Mean Diff.	Crit. Diff.
Control, Ultra EZ	.016	.018
Control, Nano P	.007	.018
Control, Bioglass T5	.015	.018
Control, Bioglass F18	.017	.018
Ultra EZ, Nano P	-.009	.018
Ultra EZ, Bioglass T5	-.001	.018
Ultra EZ, Bioglass F18	.001	.018
Nano P, Bioglass T5	.008	.018
Nano P, Bioglass F18	.010	.018
Bioglass T5, Bioglass F18	.002	.018

ESTATÍSTICA - ALAMAR BLUE

TESTE NÃO PARAMÉTRICO DE KRUSKAL-WALLIS. POS TESTE DE STUDENT-NEWMAN-KEULS

COMPARAÇÃO ENTRE OS TEMPOS DENTRO DE CADA GRUPO – GRUPO C1

1 – 15 min 2 – 24 hrs 3 – 48 hrs

(p) Kruskal-Wallis = 0.0496

Comparações Student-Newman-Keuls	Dif. Postos	p-valor
Grupos (1 e 2) =	3.6667	0.1011
Grupos (1 e 3) =	5.3333	0.0171
Grupos (2 e 3) =	1.6667	0.4561

COMPARAÇÃO ENTRE OS TEMPOS DENTRO DE CADA GRUPO – GRUPO C2

1 – 15 min 2 – 24 hrs 3 – 48 hrs

(p) Kruskal-Wallis = 0.0635

COMPARAÇÃO ENTRE OS TEMPOS DENTRO DE CADA GRUPO – GRUPO B1

1 – 15 min 2 – 24 hrs 3 – 48 hrs

(p) Kruskal-Wallis = 0.3576

COMPARAÇÃO ENTRE OS TEMPOS DENTRO DE CADA GRUPO – GRUPO B2

1 – 15 min 2 – 24 hrs 3 – 48 hrs

(p) Kruskal-Wallis = 0.2881

COMPARAÇÃO ENTRE OS TEMPOS DENTRO DE CADA GRUPO – GRUPO B3 REPEAT

1 – 15 min 2 – 24 hrs 3 – 48 hrs

(p) Kruskal-Wallis = 0.0509

COMPARAÇÃO ENTRE OS TEMPOS DENTRO DE CADA GRUPO – GRUPO B4

1 – 15 min 2 – 24 hrs 3 – 48 hrs

(p) Kruskal-Wallis = 0.7066

COMPARAÇÃO ENTRE OS GRUPOS DENTRO DE CADA TEMPO – 15 MIN

1 – C1 2 – C2 3 – B1 4 – B2 5 – B3 REPEAT 6 – B4

(p) Kruskal-Wallis = 0.0139

Comparações Student-Newman-Keuls	Dif. Postos	p-valor
Grupos (1 e 2) =	3.0000	0.4913
Grupos (1 e 3) =	12.1667	0.0053
Grupos (1 e 4) =	10.3333	0.0178
Grupos (1 e 5) =	6.6667	0.1262
Grupos (1 e 6) =	12.8333	0.0032
Grupos (2 e 3) =	9.1667	0.0355
Grupos (2 e 4) =	7.3333	0.0925

Grupos (2 e 5) =	3.6667	0.4002
Grupos (2 e 6) =	9.8333	0.0241
Grupos (3 e 4) =	1.8333	0.6741
Grupos (3 e 5) =	5.5000	0.2070
Grupos (3 e 6) =	0.6667	0.8784
Grupos (4 e 5) =	3.6667	0.4002
Grupos (4 e 6) =	2.5000	0.5663
Grupos (5 e 6) =	6.1667	0.1571

COMPARAÇÃO ENTRE OS GRUPOS DENTRO DE CADA TEMPO – 24 HRS

1 – C1 2 – C2 3 – B1 4 – B2 5 – B3 REPEAT 6 – B4

(p) Kruskal-Wallis = 0.0074

Comparações Student-Newman-Keuls	Dif. Postos	p-valor
Grupos (1 e 2) =	3.3333	0.4444
Grupos (1 e 3) =	13.8333	0.0015
Grupos (1 e 4) =	9.1667	0.0355
Grupos (1 e 5) =	5.6667	0.1936
Grupos (1 e 6) =	13.0000	0.0029
Grupos (2 e 3) =	10.5000	0.0160
Grupos (2 e 4) =	5.8333	0.1808
Grupos (2 e 5) =	2.3333	0.5924
Grupos (2 e 6) =	9.6667	0.0266
Grupos (3 e 4) =	4.6667	0.2843
Grupos (3 e 5) =	8.1667	0.0610
Grupos (3 e 6) =	0.8333	0.8484
Grupos (4 e 5) =	3.5000	0.4220
Grupos (4 e 6) =	3.8333	0.3792
Grupos (5 e 6) =	7.3333	0.0925

COMPARAÇÃO ENTRE OS GRUPOS DENTRO DE CADA TEMPO – 48 HRS

1 – C1 2 – C2 3 – B1 4 – B2 5 – B3 REPEAT 6 – B4

(p) Kruskal-Wallis = 0.0190

Comparações Student-Newman-Keuls	Dif. Postos	p-valor
Grupos (1 e 2) =	2.6667	0.5407
Grupos (1 e 3) =	8.6667	0.0468
Grupos (1 e 4) =	10.6667	0.0144
Grupos (1 e 5) =	0.3333	0.9390
Grupos (1 e 6) =	10.6667	0.0144
Grupos (2 e 3) =	6.0000	0.1687
Grupos (2 e 4) =	8.0000	0.0665
Grupos (2 e 5) =	2.3333	0.5924
Grupos (2 e 6) =	8.0000	0.0665
Grupos (3 e 4) =	2.0000	0.6464
Grupos (3 e 5) =	8.3333	0.0559
Grupos (3 e 6) =	2.0000	0.6464
Grupos (4 e 5) =	10.3333	0.0178
Grupos (4 e 6) =	0.0000	1.0000
Grupos (5 e 6) =	10.3333	0.0178

ESTATÍSTICA – % MORTALIDADE

TESTE PORCENTAGEM DE MORTALIDADE – TESTE NÃO PARAMÉTRICO DE KRUSKAL-WALLIS E PÓS TESTE DE STUDENT-NEWMAN KEULS

COMPARAÇÃO ENTRE OS TEMPOS – GRUPO C1

1 – 15 MIN 2- 24 HRS 3 – 48 HRS

(p) Kruskal-Wallis = 1.0000

COMPARAÇÃO ENTRE OS TEMPOS – GRUPO C2

1 – 15 MIN 2- 24 HRS 3 – 48 HRS

(p) Kruskal-Wallis = 0.3932

COMPARAÇÃO ENTRE OS TEMPOS – GRUPO B1

1 – 15 MIN 2- 24 HRS 3 – 48 HRS

(p) Kruskal-Wallis = 0.2521

COMPARAÇÃO ENTRE OS TEMPOS – GRUPO B2

1 – 15 MIN 2- 24 HRS 3 – 48 HRS

(p) Kruskal-Wallis = 0.5611

COMPARAÇÃO ENTRE OS TEMPOS – GRUPO B3 REPEAT

1 – 15 MIN 2- 24 HRS 3 – 48 HRS

(p) Kruskal-Wallis = 0.1133

COMPARAÇÃO ENTRE OS TEMPOS – GRUPO B4

1 – 15 MIN 2- 24 HRS 3 – 48 HRS

(p) Kruskal-Wallis = 0.2019

COMPARAÇÃO ENTRE OS GRUPOS – TEMPO 15 MIN

1 – C1 2- C2 3 – B1 4 – B2 5 – B3 REPEAT 6 – B4

(p) Kruskal-Wallis = 0.0196

Comparações	Student-Newman-Keuls	Dif. Postos	p-valor
Grupos (1 e 2) =	3.0000	0.4913	
Grupos (1 e 3) =	11.5000	0.0083	
Grupos (1 e 4) =	10.6667	0.0144	
Grupos (1 e 5) =	7.3333	0.0925	
Grupos (1 e 6) =	12.5000	0.0041	
Grupos (2 e 3) =	8.5000	0.0512	
Grupos (2 e 4) =	7.6667	0.0786	
Grupos (2 e 5) =	4.3333	0.3202	
Grupos (2 e 6) =	9.5000	0.0293	
Grupos (3 e 4) =	0.8333	0.8484	
Grupos (3 e 5) =	4.1667	0.3391	
Grupos (3 e 6) =	1.0000	0.8185	

Grupos (4 e 5) =	3.3333	0.4444
Grupos (4 e 6) =	1.8333	0.6741
Grupos (5 e 6) =	5.1667	0.2359

COMPARAÇÃO ENTRE OS GRUPOS – TEMPO 24 HRS

1 – C1 2- C2 3 – B1 4 – B2 5 – B3 REPEAT 6 – B4

(p) Kruskal-Wallis = 0.0090

Comparações Student-Newman-Keuls	Dif. Postos	p-valor
Grupos (1 e 2) =	3.0000	0.4913
Grupos (1 e 3) =	14.1667	0.0012
Grupos (1 e 4) =	8.5000	0.0512
Grupos (1 e 5) =	7.0000	0.1083
Grupos (1 e 6) =	12.3333	0.0047
Grupos (2 e 3) =	11.1667	0.0104
Grupos (2 e 4) =	5.5000	0.2070
Grupos (2 e 5) =	4.0000	0.3588
Grupos (2 e 6) =	9.3333	0.0323
Grupos (3 e 4) =	5.6667	0.1936
Grupos (3 e 5) =	7.1667	0.1001
Grupos (3 e 6) =	1.8333	0.6741
Grupos (4 e 5) =	1.5000	0.7308
Grupos (4 e 6) =	3.8333	0.3792
Grupos (5 e 6) =	5.3333	0.2211

COMPARAÇÃO ENTRE OS GRUPOS – TEMPO 48 HRS

1 – C1 2- C2 3 – B1 4 – B2 5 – B3 REPEAT 6 – B4

(p) Kruskal-Wallis = 0.0245

Comparações Student-Newman-Keuls	Dif. Postos	p-valor
Grupos (1 e 2) =	3.0000	0.4913
Grupos (1 e 3) =	9.0000	0.0389
Grupos (1 e 4) =	11.3333	0.0093
Grupos (1 e 5) =	9.0000	0.0389
Grupos (1 e 6) =	12.6667	0.0037
Grupos (2 e 3) =	6.0000	0.1687
Grupos (2 e 4) =	8.3333	0.0559
Grupos (2 e 5) =	6.0000	0.1687
Grupos (2 e 6) =	9.6667	0.0266
Grupos (3 e 4) =	2.3333	0.5924
Grupos (3 e 5) =	0.0000	1.0000
Grupos (3 e 6) =	3.6667	0.4002
Grupos (4 e 5) =	2.3333	0.5924
Grupos (4 e 6) =	1.3333	0.7597
Grupos (5 e 6) =	3.6667	0.4002

ESTATÍSTICA - QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNA

TESTE PROTEIN ASSAY – TESTE DE KRUSKAL-WALLIS E POS TESTE DE STUDENT-NEWMANN-KEULS

COMPARAÇÃO ENTRE OS TEMPOS - GRUPO C1

1 – 15 MIN 2- 24 HRS 3 – 48 HRS

(p) Kruskal-Wallis = 0.1479

COMPARAÇÃO ENTRE OS TEMPOS - GRUPO C2

1 – 15 MIN 2- 24 HRS 3 – 48 HRS

(p) Kruskal-Wallis = 0.0608

COMPARAÇÃO ENTRE OS TEMPOS - GRUPO B1

1 – 15 MIN 2- 24 HRS 3 – 48 HRS

(p) Kruskal-Wallis = 0.0509

COMPARAÇÃO ENTRE OS TEMPOS - GRUPO B2

1 – 15 MIN 2- 24 HRS 3 – 48 HRS

(p) Kruskal-Wallis = 0.0608

COMPARAÇÃO ENTRE OS TEMPOS - GRUPO B3 REPEAT

1 – 15 MIN 2- 24 HRS 3 – 48 HRS

(p) Kruskal-Wallis = 0.0665

COMPARAÇÃO ENTRE OS TEMPOS - GRUPO B4

1 – 15 MIN 2- 24 HRS 3 – 48 HRS

(p) Kruskal-Wallis = 0.2881

COMPARAÇÃO ENTRE OS GRUPOS - TEMPO DE 15 MIN

1 – C1 2- C2 3 – B1 4 – B2 5 – B3 REPEAT 6 – B4

(p) Kruskal-Wallis = 0.0640

COMPARAÇÃO ENTRE OS GRUPOS - TEMPO DE 24 HRS

1 – C1 2- C2 3 – B1 4 – B2 5 – B3 REPEAT 6 – B4

(p) Kruskal-Wallis = 0.0153

Comparações Student-Newman-Keuls	Dif. Postos	p-valor
Grupos (1 e 2) =	2.3333	0.5924
Grupos (1 e 3) =	9.0000	0.0389
Grupos (1 e 4) =	6.6667	0.1262
Grupos (1 e 5) =	2.0000	0.6464
Grupos (1 e 6) =	4.3333	0.3202
Grupos (2 e 3) =	11.3333	0.0093
Grupos (2 e 4) =	9.0000	0.0389
Grupos (2 e 5) =	4.3333	0.3202
Grupos (2 e 6) =	2.0000	0.6464
Grupos (3 e 4) =	2.3333	0.5924
Grupos (3 e 5) =	7.0000	0.1083
Grupos (3 e 6) =	13.3333	0.0022
Grupos (4 e 5) =	4.6667	0.2843

Grupos (4 e 6) =	11.0000	0.0116
Grupos (5 e 6) =	6.3333	0.1462

COMPARAÇÃO ENTRE OS GRUPOS - TEMPO DE 48 HRS

1 – C1 2- C2 3 – B1 4 – B2 5 – B3 REPEAT 6 – B4

(p) Kruskal-Wallis = 0.0333

Comparações Student-Newman-Keuls	Dif. Postos	p-valor
Grupos (1 e 2) =	6.3333	0.1462
Grupos (1 e 3) =	8.3333	0.0559
Grupos (1 e 4) =	8.3333	0.0559
Grupos (1 e 5) =	9.6667	0.0266
Grupos (1 e 6) =	1.6667	0.7022
Grupos (2 e 3) =	2.0000	0.6464
Grupos (2 e 4) =	2.0000	0.6464
Grupos (2 e 5) =	3.3333	0.4444
Grupos (2 e 6) =	8.0000	0.0665
Grupos (3 e 4) =	0.0000	1.0000
Grupos (3 e 5) =	1.3333	0.7597
Grupos (3 e 6) =	10.0000	0.0218
Grupos (4 e 5) =	1.3333	0.7597
Grupos (4 e 6) =	10.0000	0.0218
Grupos (5 e 6) =	11.3333	0.0093

ANEXO C - Descrição detalhada da metodologia.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA METODOLOGIA

1. Preparo dos espécimes de dentina

Setenta molares humanos recém-extraídos obtidos de pacientes com idade entre 18 e 45 anos foram selecionados de acordo com as recomendações do Comitê de Ética local.

Os espécimes foram limpos com curetas periodontais (McCall #13/14 e #17/18, Millennium - Golgran, São Caetano do Sul, São Paulo, Brasil), imersos em solução de hipoclorito de sódio 2,5% (Cloro Rio, Rioquímica S/A, São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil) diluído em água (proporção 1:5) por dez minutos em temperatura ambiente para remover detritos orgânicos, e então lavados com água destilada e congelados a -6°C até o início do experimento (Figura 1). Dentes com evidência de cárie, reabsorção radicular, trincas ou fraturas foram excluídos do estudo.



Figura 1: Limpeza dos dentes.

Após a limpeza, os dentes tiveram suas coroas separadas das raízes no nível da junção cemento-esmalte através de uma cortadeira de precisão (Isomet 5000, Buehler Ltd,

Lake Bluff, Illinois, Estados Unidos) sob refrigeração com água. A seguir, as coroas foram fixadas com cera pegajosa (Kota, Cotia, São Paulo, Brasil) em placas de acrílico e, com auxílio de um disco diamantado dupla face (22mm 1.8g, Microdont, São Paulo, Brasil) montado em peça reta e constante irrigação, foram obtidas fatias de dentina de aproximadamente 1,5mm de espessura (Figura 2). Os cortes foram realizados com a maior distância possível entre si, que era em média 3mm (Figura 2). Foi realizada uma marcação na superfície oclusal das fatias para que futuramente os tratamentos fossem realizados sobre a mesma. As superfícies foram manualmente desgastadas por meio de movimentos circulares sobre lixas abrasivas de óxido de alumínio nas granulações #400 e #600 (Extec Corp., Enfield, Connecticut, Estados Unidos) sob irrigação até que apresentassem formato quadrado e espessura de 1mm, verificada em paquímetro digital (modelo CD-6”CX-B, Mitutoyo Sul América Ltd., Suzano, São Paulo, Brasil) (Figura 2). Os espécimes foram lavados em água deionizada e armazenados individualmente em eppendorfs contendo 1ml de solução de Hanks (Apothecário, Araçatuba, São Paulo, Brasil) a 10°C até o momento da realização dos ensaios.

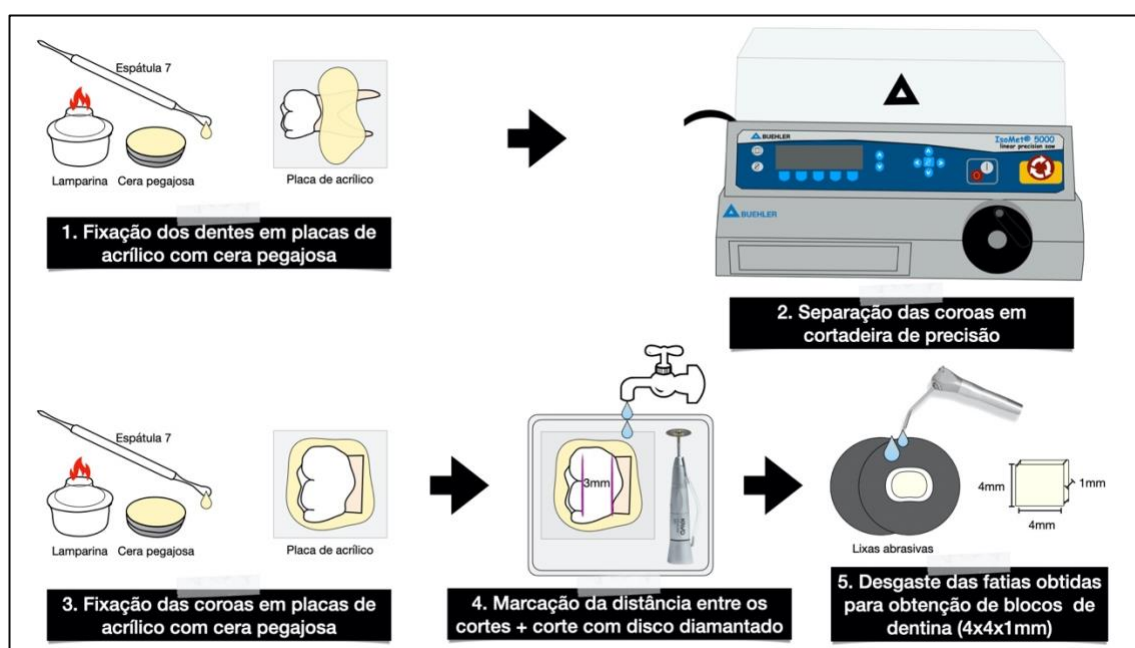


Figura 2: Obtenção dos espécimes de dentina.

2. Avaliação da permeabilidade dentinária

Primeiramente os 70 blocos de dentina foram submetidos a um processo de calibração da permeabilidade inicial, no qual foram imersos por cinco minutos em solução de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) a 17% (pH 7,4, Apothicário, Araçatuba, São Paulo, Brasil) (2ml/amostra) para remoção de *smear layer* e abertura dos túbulos dentinários. Em seguida, foram lavados com água destilada e armazenados em tubos de 2ml (Microtubo safe-lock, Eppendorf Brasil, São Paulo, São Paulo, Brasil) (amostra posicionada entre duas bolinhas de algodão umedecidas) até o momento da análise (aproximadamente 72 horas, visto que as amostras foram preparadas na Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP e esta análise foi realizada no Instituto de Ciência e Tecnologia - UNESP, em São José dos Campos). Assim, as 70 amostras foram submetidas ao teste inicial da permeabilidade para calibrar as medidas do movimento de fluido através dos túbulos dentinários, e 50 foram selecionadas. Comparando os diferentes espécimes, aqueles que apresentaram maior discrepância nos valores de permeabilidade foram eliminados do experimento. Espécimes cujas permeabilidades permaneceram com valores aproximados de médias foram distribuídos de forma aleatória entre os cinco grupos experimentais (n=10).

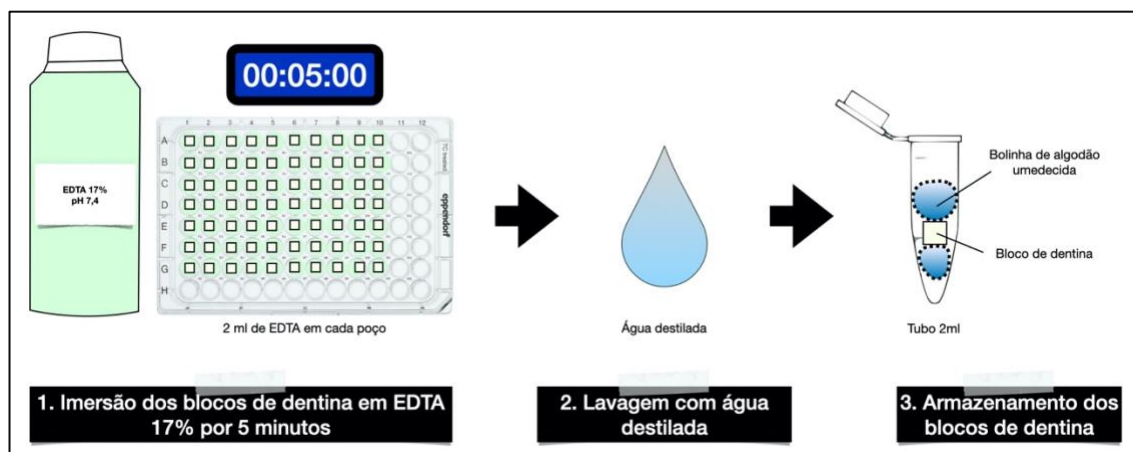


Figura 3: Preparo químico das amostras para a análise de permeabilidade dentinária.

Para a realização da análise, os espécimes foram acoplados a um equipamento com um sistema de infiltração de fluido (THDO3d, Série WMD 3001, Odeme, Luzerna, Santa Catarina, Brasil). Tal equipamento simula a passagem de fluido pela dentina que ocorre devido à pressão intrapulpar, através de um movimento constante de água deionizada sob uma pressão de 10psi. Para cada análise, uma nova bolha de ar foi inserida no sistema e seu deslocamento linear (em milímetros) através de um microcapilar (100 μL) foi medido por três minutos utilizando um paquímetro digital. A análise foi repetida por três vezes em cada espécime. A média aritmética do deslocamento entre as três leituras foi calculada, convertida em volume de fluxo ($\mu\text{l}/\text{min}$), e transformada em condutância hidráulica (L_p ; $\mu\text{l}.\text{cm}^2/\text{min}.\text{cm H}_2\text{O}$). A condutância hidráulica considera a área do espécime pela qual a água atravessou (área= 0.16cm^2), a pressão do sistema (10psi) e o volume do fluxo (100 μl).

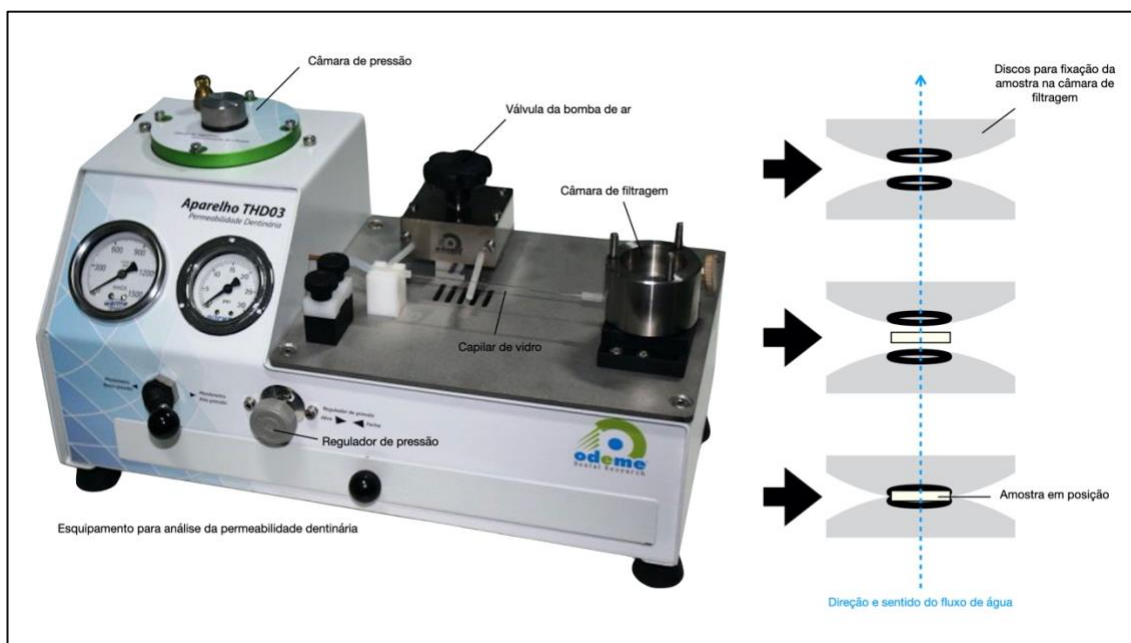


Figura 4: Equipamento para a análise de permeabilidade dentinária.

3. Tratamentos dessensibilizantes

A descrição da composição, fabricantes, e protocolos de aplicação dos produtos empregados em cada grupo estão expostos na Tabela 1. Os produtos foram aplicados na superfície oclusal (previamente marcada) dos blocos de dentina. Após aplicação dos produtos, os espécimes de dentina foram abundantemente enxaguados com água destilada (Figura 5).

Para simular produtos em forma de solução disponíveis no mercado, as partículas dos vidros bioativos T5-OH e F18 foram misturadas com água destilada. Em um tubo de 2ml (Microtubo safe-lock, Eppendorf Brasil, São Paulo, São Paulo, Brazil) contendo 0,1g de pó do vidro bioativo foi acrescentado 1ml de água, gerando uma mistura na proporção 1:10 de cada vidro bioativo em água destilada (Figura 6).

Após a aplicação dos diferentes produtos, a análise de permeabilidade dentinária foi realizada da mesma maneira descrita anteriormente.

Tabela 1: Descrição da composição, fabricantes, e protocolos de aplicação dos produtos utilizados no estudo.

Tratamento	Composição	Fabricante	Protocolo de Aplicação
Controle (saliva artificial)	CaCl ₂ .2H ₂ O, 0,167g; KH ₂ PO ₄ , 0,123g; KCl, 11,2g; (HOCH ₂) ₃ CHN ₂ , 2,42g; água destilada; pH 7	Apothicário, Araçatuba, São Paulo, Brasil	Imersão das amostras em 1ml da solução por 15 minutos; 1× por dia durante 15 dias consecutivos.
Ultra EZ	Nitrato de potássio (3%), fluoreto (0,25%)	Ultradent, South Jordan, Utah, Estados Unidos	Aplicação ativa do produto usando um aplicador microbrush; permanência do produto sobre a amostra por 15 minutos; remoção dos excessos com bolinha de algodão; 1× por dia durante 15 dias consecutivos.
Desensibilize Nano P	Fosfato de cálcio nanométrico (como hidroxiapatita), fluoreto de sódio (aproximadamente 2%), nitrato de potássio 5%.	FGM, Joinville, Santa Catarina, Brasil	
Vidro Bioativo T5-OH diluído em água destilada (10%) ³⁶	Micropartículas de Vidro Bioativo T5-OH 10% (1-10µm)	Vitrovita, São Carlos, São Paulo, Brazil	
Vidro Bioativo F18 diluído em água destilada (10%) ³⁶	Na ₂ CO ₃ , K ₂ CO ₃ , K ₂ HPO ₄ , Na ₂ HPO ₄ , CaCO ₃ , SiO ₂ , Al ₂ O ₃ , ZnO, SrCO ₃ , B ₂ O ₃ .	Vitrovita, São Carlos, São Paulo, Brazil	

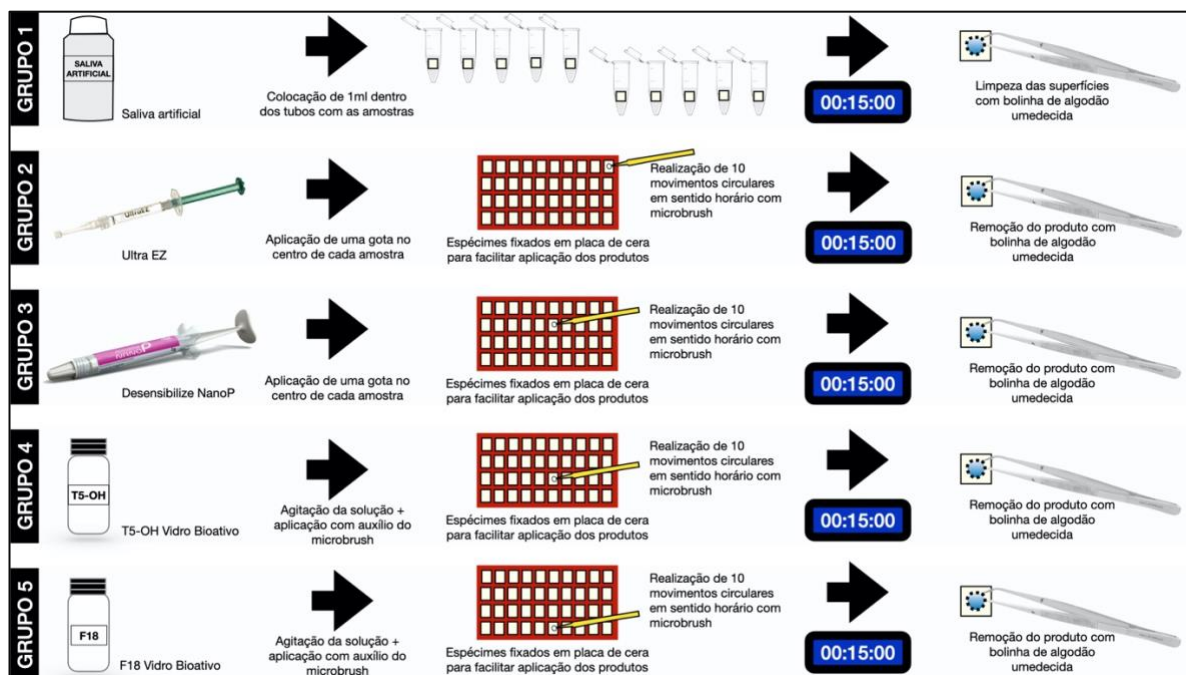


Figura 5: Protocolo de aplicação dos produtos.



Figura 6: Preparo das soluções dos vidros bioativos T5-OH e F18.

4. Desafio com ácido cítrico

Após as aplicações dos produtos descritas acima, as amostras receberam tratamento com ácido cítrico para simular desmineralização erosiva. Em seguida, uma nova análise de permeabilidade foi realizada para testar a estabilidade da obliteração causada pelos agentes dessensibilizantes.

Os espécimes de dentina foram submetidos à um ciclo de desafio ácido durante sete dias de acordo com o seguinte protocolo: imersão em solução de ácido cítrico a 0,5% (1ml/amostra) (pH 2,5) (Apothicário, Araçatuba, São Paulo, Brasil) seis vezes ao dia por dois minutos cada, sob agitação em mesa agitadora (aproximadamente 100rpm e 26 °C). Entre as imersões, as amostras foram armazenadas em saliva artificial a 37 °C (em estufa) por aproximadamente 1 hora (Figura 7).

Para a realização deste desafio foram manipulados 3 litros de ácido cítrico e 2 litros de saliva artificial. Foi realizada troca do ácido a cada nova imersão, e da saliva uma vez por dia. Entre as trocas, as amostras foram cuidadosamente limpas em guardanapo de papel (Guardanapos Scott®, Grand Hotel®, Kimberly-Clark Brasil Indústria e Comércio de Produtos de Higiene Ltda., Mogi das Cruzes, São Paulo, Brasil). Ao final do ciclo, as amostras foram novamente armazenadas em tubos de 2ml entre duas bolinhas de algodão umedecidas.

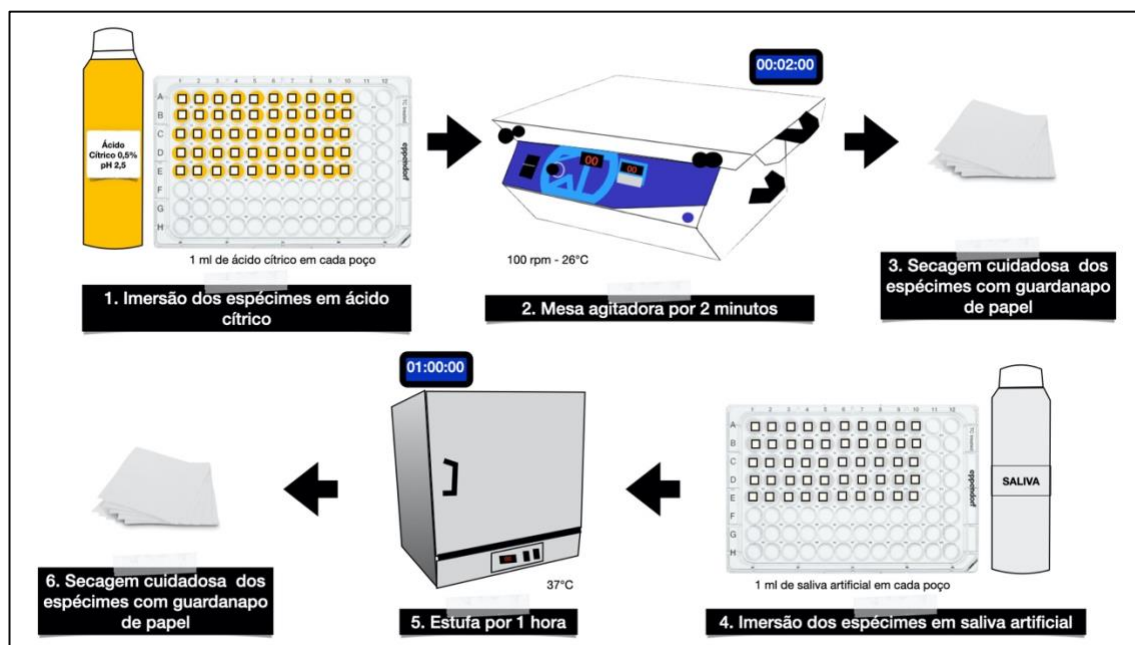


Figura 7: Protocolo seguido no ciclo do desafio com ácido cítrico.

5. Avaliação final da permeabilidade dentinária

A análise da permeabilidade dentinária, após a aplicação dos diferentes tratamentos e após o desafio ácido, foi realizada da mesma maneira descrita anteriormente.

6. Espectroscopia de energia dispersiva (EDS)

As mensurações por espectroscopia de energia dispersiva foram realizadas em duas amostras representativas de cada grupo. O conteúdo dos elementos em porcentagem de peso (wt%) de cálcio (Ca) e fósforo (P) foi medido através do detector EDS BRUKER e o programa Espirit 1.9 (© 2015 Bruker Nano GmbH, Berlin, Alemanha) (Figura 8). A taxa de contagem por segundos (cps) foi de 7000 com um intervalo de processamento de 5%. O tempo de medida foi de um minuto e 30 segundos. Foi calculada a média aritmética para as mensurações obtidas em cada espécime. Para esta análise nenhum preparo nas amostras foi necessário.

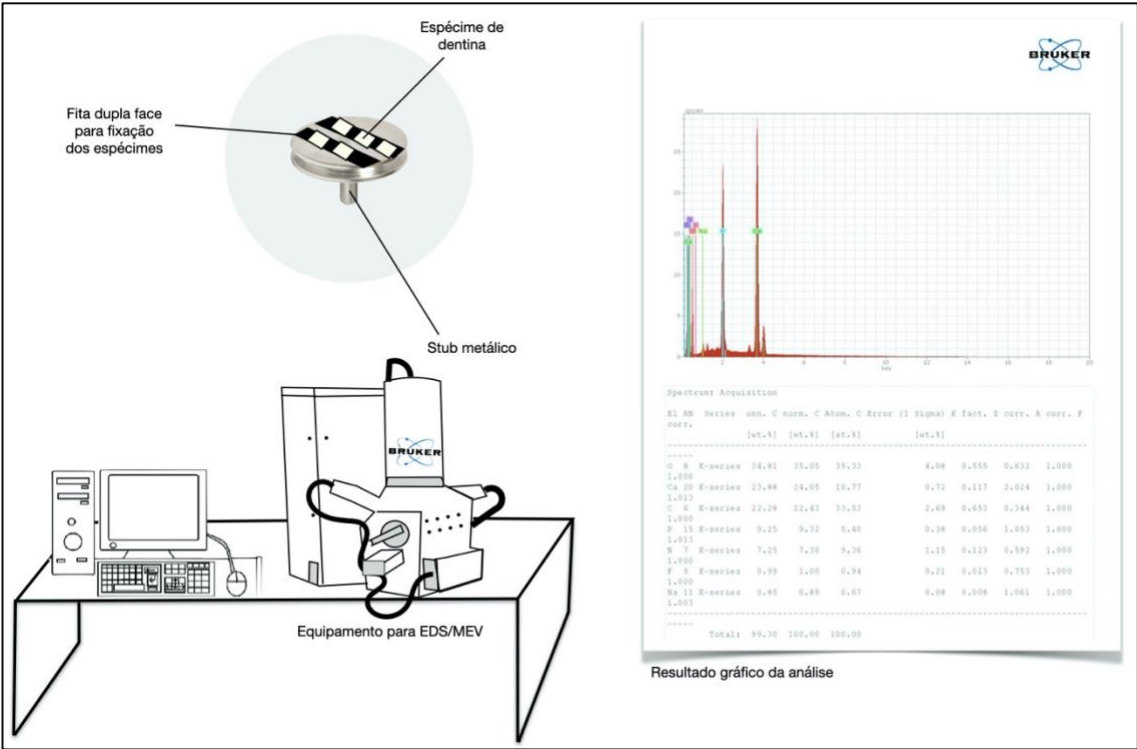


Figura 8: Ilustração da análise de espectroscopia de energia dispersiva.

7. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Amostras representativas de cada grupo submetidas a um processo de desidratação em dessecador a vácuo (campânula de vidro contendo sílica em seu interior) para que a maior quantidade de água possível fosse removida dos espécimes, proporcionando a obtenção de melhores imagens em MEV. Foi seguido o seguinte protocolo para a desidratação: 1) cada espécime foi colocado dentro de um tubo de 2ml (Eppendorf®) com a tampa aberta para que houvesse contato entre espécime e ar; 2) os tubos foram posicionados em um suporte próprio para tubos e colocados dentro da campânula com sílica; 3) removeu-se todo o ar presente no interior da campânula através de uma bomba de sucção; 4) permanência dos espécimes dentro da campânula por 24 horas (Figura 9).

Após este tempo, as amostras foram fixadas em *stub* (suporte) metálico, revestidas com ouro, e levadas dentro do Microscópio Eletrônico de Varredura (Inspect S50, FEI, Tóquio, Japão) para obtenção de imagens nos aumentos de 500X, 2000X e 5000X para análise qualitativa dos túbulos dentinários em todas as fases do experimento (inicial, após tratamentos, e após desafio ácido) (Figura 9).

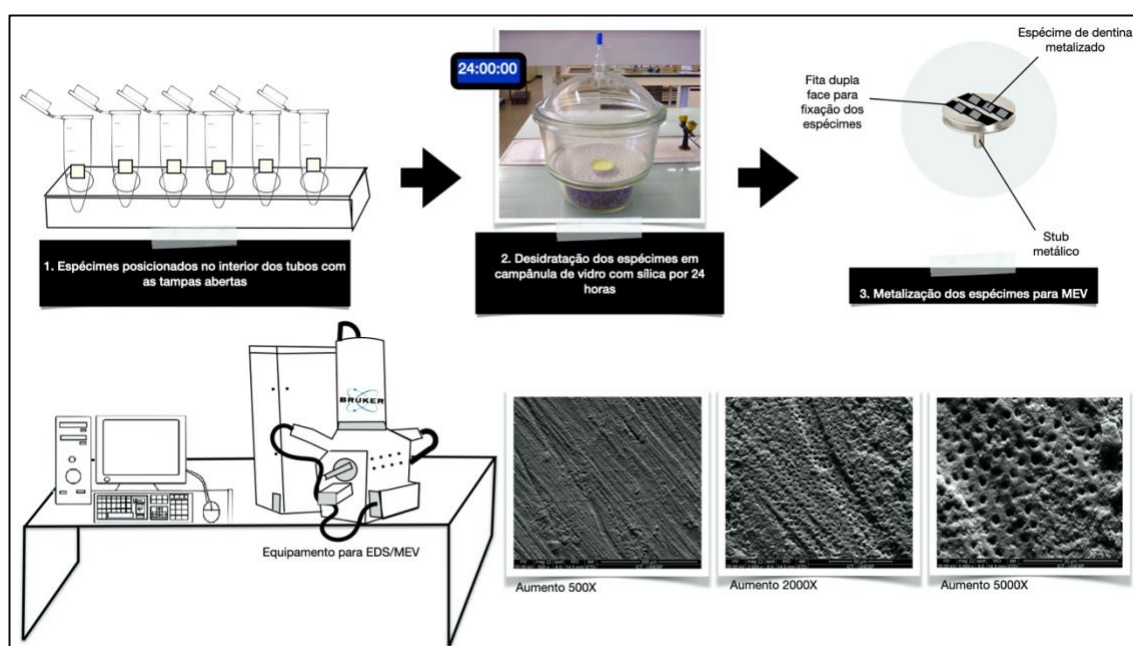


Figura 9: Ilustração do preparo dos espécimes e análise de microscopia eletrônica de varredura.

8. Protocolo das análises biológicas

As análises biológicas foram realizadas na Faculdade de Odontologia da Universidade de Toronto, sob supervisão da professora Anuradha Prakki, durante doutorado sanduíche financiado pela CAPES (bolsa CAPES-PRINT-UNESP, processo 88887.363216/2019-00).

Todo o protocolo para realização do experimento encontra-se descrito, passo a passo, a seguir:

1-Compra das células

A compra das células foi realizada online, através do site **www.caderlane.com**. No site, o pedido foi descrito como HGF - 1: Gingival Fibroblast; Human (Homo sapiens); e o código do produto CRL - 2014 (1ml).

2-Descongelamento das células

Primeiramente, o equipamento para descongelamento em banho maria foi preenchido com água estéril. Em seguida, foram posicionados Beckers (deixando a água preencher seu interior) e um suporte de plástico (próprio para os tubos de plástico a serem utilizados) no interior do equipamento para que nenhum material fosse colocado “solto” dentro da água. O equipamento foi ligado e quatro tubos de 15ml contendo solução recém-produzida de meio de cultura (10ml cada) foi colocado no suporte dentro da água até que alcançasse a temperatura de 37°C (aproximadamente 30 minutos).

Durante os minutos de espera, a cabine de biossegurança foi ligada e limpa com álcool 70%, assim como todos os materiais antes de serem colocados dentro da cabine. Após aquecido, o tubo contendo meio foi retirado do banho maria e levado para a cabine de segurança. Foi adicionado 10ml do meio de cultura fresco em um frasco T-75 e o mesmo foi levado para a incubadora (37°C) para ajustar temperatura novamente enquanto foram realizados os próximos passos. Enquanto isso, o recipiente contendo as células que estava armazenado em nitrogênio líquido foi levado ao equipamento de descongelamento, onde ficou imerso parcialmente na água dentro do Becker (Figura 10), por aproximadamente dois minutos (ob.: o conteúdo congelado do recipiente com as células apresenta coloração bege, e após descongelado, vermelha).

Após descongelamento, o recipiente com as células foi levado para a cabine de segurança novamente. Com a pipeta, foi adicionado 1ml de meio fresco, misturando delicadamente. Após mistura, todo o conteúdo do recipiente contendo as células (aproximadamente 1ml) foi pipetado em um novo tubo contendo 9ml de meio fresco.

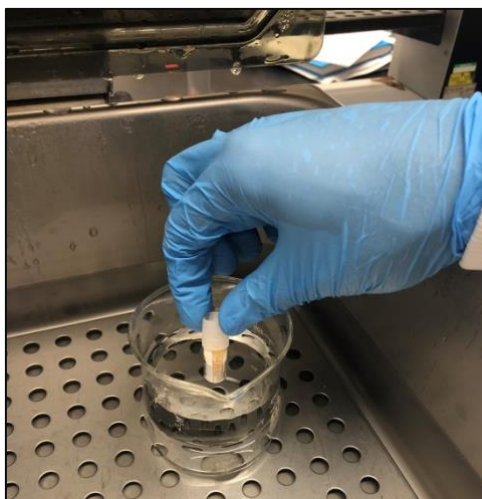


Figura 10: Fotografia da forma como o recipiente contendo as células congeladas foi mantido em posição dentro do Becker, no equipamento para descongelamento.

O próximo passo foi a centrifugação para separação do conteúdo (células e meio). Dentro da centrífuga o peso precisa ser balanceado e, por esse motivo, como ao final do descongelamento o nosso recipiente contendo as células continha 10ml de conteúdo (células + meio), foi colocado 10ml de água em um outro tubo do mesmo tamanho para servir de contrapeso. Após, ambos os tubos foram levados para a centrífuga, com configuração (Figura 11): a) Velocidade: 125 x g; b) Tempo: 07:00 minutos; c) Temperatura: 21°C. Ao final da centrifugação foi possível visualizar uma camada branca no fundo do tubo, que são as células separadas do meio.

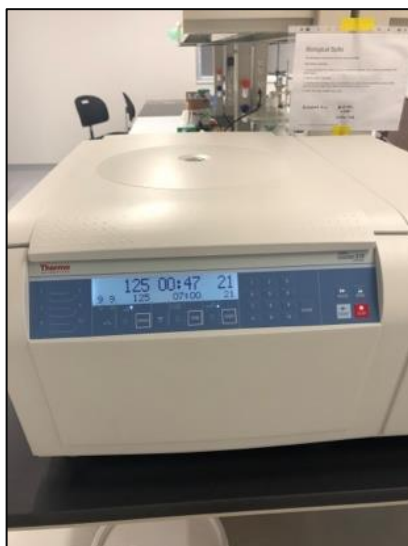


Figura 11: Fotografia do equipamento de centrifugação.

Após a centrifugação, o tubo foi levado novamente à cabine de biossegurança. Com a pipeta, o meio (supernadante) foi removido cuidadosamente. Em seguida, foi adicionado aproximadamente 3ml de meio fresco, pipetando gentilmente para cima e para baixo no interior do tubo para desagregar as células. Esse meio foi colocado no frasco T-75 que estava na incubadora ajustando a temperatura. Foi anotado o número da passagem (no caso, 1), nossos nomes e a data no frasco. O frasco foi levado em microscópio óptico para conferir se as células se encontravam espalhadas pelo meio e

depois levado novamente para a incubadora (Figura 12). As células foram checadas em microscópio a cada 24 horas para conferir as condições do meio, se as células estavam vivas e se multiplicando.



Figura 12: Fotografia dos frascos posicionados dentro da incubadora.

3-Preparo de novo meio de cultura para trocas

Observações importantes sobre os critérios para substituição do meio:

- O meio fresco possui coloração vermelha. Se ao checar estivesse rosado, significava que ainda estava normal e não precisaria ser trocado nos próximos 3 dias;
- Se ao checar estivesse mais alaranjado, significava que poderia esperar de 24 a 48 horas para ser trocado ainda;
- Se amarelo, significava que precisava ser trocado e as células deveriam ser observadas com mais atenção;
- Se esbranquiçado, com aspecto embaçado, significava contaminação e morte das células.

Para preparo de novo meio, primeiramente foi realizado o cálculo da quantidade necessária de meio e das proporções de cada componente da solução de acordo com a regra: 10% FBS + 1% Antibiótico + DMEM. Por exemplo: para 40ml de meio = 4ml de FBS + 0,4ml de antibiótico + DMEM até completar 40ml.

Em seguida, os componentes foram levados em banho maria por aproximadamente 30 minutos para adequação da temperatura (37°C). A cabine de biossegurança foi ligada 10 minutos antes de iniciar os procedimentos e limpa com álcool 70%, assim como todos os materiais antes de serem colocados dentro da cabine. Todos os produtos foram levados para a cabine, pipetados dentro de um tubo de plástico conforme as proporções calculadas, e gentilmente misturados. A solução foi armazenada em geladeira.

4-Trocas do meio de cultura

O meio foi levado em banho maria por aproximadamente 30 minutos para adequação da temperatura (37°C). A cabine de biossegurança foi ligada 10 minutos antes de iniciar os procedimentos e limpa com álcool 70%, assim como todos os materiais antes de serem colocados dentro da cabine.

Com auxílio da pipeta, o meio foi removido do frasco com as células e descartado em um tubo de plástico nomeado como “descarte”. Em seguida, de forma rápida para que as células não ficassem sem meio por muito tempo, foi adicionado 3ml de tripsina (gota a gota e delicadamente) para limpeza. A tripsina foi pipetada para fora do frasco e descartada no tubo de descarte.

Se usando frasco T-75, foi adicionado 12ml de meio fresco; e se usando frasco T-25 foi adicionado 4ml de meio fresco. Por fim, o frasco foi levado novamente para a incubadora.

5-Passagem das células (Subcultura)

O meio foi levado em banho maria por aproximadamente 30 minutos para adequação da temperatura (37°C). A cabine de biossegurança foi ligada 10 minutos antes de iniciar os procedimentos e limpa com álcool 70%, assim como todos os materiais antes de serem colocados dentro da cabine.

Com auxílio da pipeta, o meio foi removido do frasco com as células e descartado em um tubo de plástico nomeado como “descarte”. Em seguida, de forma rápida para que as células não ficassem sem meio por muito tempo, foi adicionado 1ml de tripsina (gota a gota e delicadamente) para limpeza. A tripsina foi rapidamente pipetada para fora do frasco e descartada no tubo de descarte.

Foi adicionado 3ml de tripsina nos frascos T-57 (ou 1,5ml nos T-25) e os mesmos foram levados em incubadora por 3 minutos. Após, foi adicionado 12ml de meio fresco nos frascos T-75 (ou 4ml nos T-25). Foi anotado o número da passagem, nossos nomes e a data nos frascos e os mesmos foram levados novamente para a incubadora.

Observações:

- a) Para passar as células de um frasco T-25 (menor) para um frasco T-75 (maior) a proporção adotada foi: 1,5ml de tripsina + 12ml de meio;
- b) E para dividir as células de um frasco T-75 em 3: 1ml de tripsina + 12ml de meio por frasco;
- c) As células foram divididas todas as vezes que cresceram a ponto de ocupar aproximadamente 80% do meio (checadas em microscópio óptico) e foram cultivadas até atingirem uma quantidade suficiente para realização do experimento.

6- DIA 1 DO EXPERIMENTO: Semeadura

DELINEAMENTO

Foi realizado com base na literatura. De acordo com outro estudo previamente realizado no laboratório, são necessárias 5mil células por poço da placa de cultivo de 96 poços. Como no presente estudo foram 6 grupos (controle 1 - somente células; controle 2 - células e água; Ultra EZ; Desensibilize NanoP; Biovidro T5-OH; e Biovidro F18), foram calculados 18 poços por grupo, multiplicados por 3 (porque o experimento foi em triplicata), resultando em um total de 900.000 células necessárias no total. Cada poço comporta 200µl. Assim, também com base na literatura, foi determinada a utilização de 50µl de “tratamento” e 150µl de meio de cultura por poço.

MÉTODO

Meio e tripsina foram colocados em banho maria por aproximadamente 30 minutos para adequação da temperatura. A cabine de biossegurança foi ligada 10 minutos antes de iniciar os procedimentos e limpa com álcool 70%, assim como todos os materiais antes de serem colocados dentro da cabine.

Para este experimento foram cultivados 4 frascos T-75 de células, porém foram escolhidos apenas os 3 com maior número para serem utilizados. Foi removido todo o meio que estava em cada frasco. Imediatamente após, foi colocado 3ml de tripsina em cada frasco e os mesmos foram levados em incubadora por 3 minutos para que as células se soltassem da superfície do recipiente e pudessem ser pipetadas, juntamente com o líquido (tripsina).

Durante os 3 minutos de espera, foram colocados 7ml de meio fresco em 3 tubos de plástico de 50ml (um tubo para cada frasco que foi levado à incubadora). Após

os 3 minutos, os 3ml de tripsina (com as células) foram pipetados para fora dos frascos e colocados em cada um dos seus respectivos tubos contendo os 7ml de meio fresco.

Para a contagem das células, 10µl de solução (meio + tripsina com células) foi pipetado de cada tubo para o centro de um dispositivo específico para contagem de células e levado ao microscópio óptico para realização dos cálculos. A partir dos cálculos da quantidade de células por ml de solução, foi definida a quantidade que seria semeada em cada poço (150µl). Foram utilizadas 3 placas de 96 poços (uma placa para cada tempo de avaliação do experimento: 15 minutos; 24 horas; e 48 horas) (Figura 13).

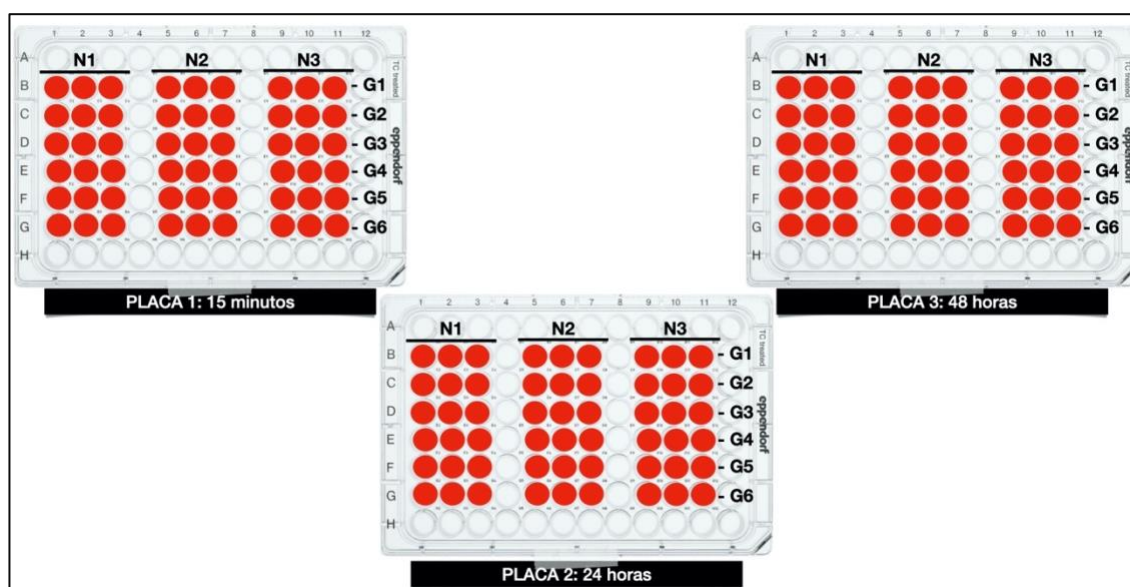


Figura 13: Esquema da organização das placas onde N representa o número de repetições (triplicata), e G o grupo experimental.

Após preenchidos os poços de acordo com o esquema representado na Figura 13, as placas foram individualmente levadas em microscópio óptico para rápida checagem e, em seguida, para a incubadora onde permaneceram por 24 horas.

7- DIA 2 DO EXPERIMENTO: Tratamentos dessensibilizantes

Meio, PBS, FBS foram colocados em banho maria por aproximadamente 30 minutos para adequação da temperatura e depois levados para a cabine de biossegurança. A cabine de biossegurança foi ligada 10 minutos antes de iniciar os procedimentos e limpa com álcool 70%, assim como todos os materiais antes de serem colocados dentro da cabine.

Para facilitar a pipetagem das soluções com a pipeta multipontas, foi colocado FBS em uma das placas de Petri, meio em outra, e solução Alamar Blue em outra.

Os tratamentos foram realizados na seguinte ordem: 1) Placa 48 horas; 2) Placa 24 horas; 3) Placa 15 minutos; com o seguinte protocolo de tratamento:

- a) o meio foi removido de todos os poços com auxílio de um sugador com ponteira apropriada e estéril;
- b) foi colocado 50 μ l de PBS em cada poço para “lavar” as células;
- c) o PBS foi removido com auxílio do sugador;
- d) 200 μ l de meio foi adicionado no G1 (grupo controle/meio);
- e) 25 μ l de água destilada + 175 μ l de meio foram adicionados no G2 (grupo controle/água destilada);
- f) 25 μ l da solução de Vidro bioativo T5-OH + 175 μ l de meio foram adicionados no G3 (grupo T5-OH);
- g) 25 μ l da solução de Vidro bioativo F18 + 175 μ l de meio foram adicionados no G4 (grupo F18);
- h) 25 μ l da solução de Ultra EZ + 175 μ l de meio foram adicionados no G5 (grupo Ultra EZ);
- i) 25 μ l da solução de Desensibilize NanoP + 175 μ l de meio foram adicionados no G6 (grupo Desensibilize NanoP);
- j) Incubadora por 15 minutos;

- k) Após os 15 minutos de tratamento, as soluções foram removidas dos poços com auxílio do sugador;
- l) As células foram lavadas com 50µl de PBS (3 vezes);
- m) O PBS foi removido dos poços com auxílio do sugador (3 vezes);
- n) 200µl de meio fresco foi colocado novamente em todos os grupos;
- o) As placas “24 horas” e “48 horas” foram levadas para incubadora por mais 24 horas para posterior repetição dos tratamentos.

Após, apenas na placa a ser analisada no dia (dia 1 = placa 15 minutos):

- a) Após os 15 minutos de tratamento, as soluções foram removidas dos poços com auxílio do sugador;
- b) As células foram lavadas com 50µl de PBS (3 vezes);
- c) O PBS foi removido dos poços com auxílio do sugador (3 vezes);
- d) Foi colocado 90µl de meio fresco em cada poço + 10µl de solução de Alamar Blue;
- e) A placa foi deixada em incubadora por 24 horas.

8- DIA 3 DO EXPERIMENTO: Análise Alamar Blue da placa “15 minutos” + Coleta dos sobrenadantes para Quantificação de Proteínas pelo Método BCA + Repetições tratamentos dessensibilizantes nas placas “24 horas” e “48 horas”

Primeiramente foi realizada a Análise Alamar Blue, com a leitura da placa “15 minutos” em computador com programa e leitor específicos.

Após a leitura, foi realizada a coleta dos conteúdos dos poços da placa analisada para posterior quantificação de proteínas pelo método BCA. Para a coleta, a placa (placa 15 minutos) foi acomodada sobre gelo, dentro de um isopor, para manter resfriamento durante procedimento. Os poços foram lavados com PBS gelado. O PBS foi

removido dos poços com auxílio de sugador. Foi acrescentado 100µl de Solução RPPA Buffer em cada poço. Aguardou-se 5 minutos. Com a ponteira da pipeta foram realizados movimentos “esfregando” cada poço. Em seguida todo o conteúdo de cada poço foi pipetado dentro do eppendorf de 1,5ml. Todos os eppendorfs foram levados em centrífuga por 10 minutos. Os sobrenadantes foram pipetados nos eppendorfs de 0,5ml e armazenados em congelador para posterior quantificação de proteínas pelo método BCA.

Realizada a coleta dos conteúdos para a quantificação de proteínas, iniciou-se o processo para repetição dos tratamentos nas placas de 24 horas e 48 horas. Meio, PBS, FBS foram colocados em banho maria por aproximadamente 30 minutos para adequação da temperatura e depois levados para a cabine de biossegurança. A cabine de biossegurança foi ligada 10 minutos antes de iniciar os procedimentos e limpa com álcool 70%, assim como todos os materiais antes de serem colocados dentro da cabine.

Os tratamentos foram realizados na seguinte ordem: 1) Placa 48 horas; 2) Placa 24 horas. O protocolo de tratamento foi o mesmo descrito no DIA 2 DO EXPERIMENTO, porém ao final dos tratamentos, apenas a placa “48 horas” voltou para a incubadora imediatamente. A placa “24 horas” recebeu a solução de Alamar Blue antes.

8- DIA 4 DO EXPERIMENTO: Análise Alamar Blue da placa “24 horas” + Coleta dos sobrenadantes para Quantificação de Proteínas pelo Método BCA + Repetições tratamentos dessensibilizantes na placa “48 horas”

Primeiramente foi realizada a Análise Alamar Blue, com a leitura da placa “24 horas” em computador com programa e leitor específicos.

Após leitura, foi realizada a coleta dos conteúdos dos poços da placa analisada para posterior quantificação de proteínas pelo método BCA seguindo o mesmo protocolo descrito no DIA 3 DO EXPERIMENTO.

Realizada a coleta dos conteúdos para a quantificação de proteínas, iniciou-se o processo para repetição dos tratamentos na placa de 48 horas. Meio, PBS, FBS foram colocados em banho maria por aproximadamente 30 minutos para adequação da temperatura e depois levados para a cabine de biossegurança. A cabine de biossegurança foi ligada 10 minutos antes de iniciar os procedimentos e limpa com álcool 70%, assim como todos os materiais antes de serem colocados dentro da cabine.

O protocolo de tratamento foi o mesmo descrito no DIA 3 DO EXPERIMENTO, porém apenas na placa “48 horas”, que ao final recebeu a solução de Alamar Blue e voltou para a incubadora por mais 24 horas.

9- DIA 5 DO EXPERIMENTO: Análise Alamar Blue da placa “48 horas” + Coleta dos sobrenadantes para Quantificação de Proteínas pelo Método BCA

Primeiramente foi realizada a Análise Alamar Blue, com a leitura da placa “48 horas” em computador com programa e leitor específicos. Após leitura, foi realizada a coleta dos conteúdos dos poços da placa analisada para posterior quantificação de proteínas pelo método BCA conforme já descrito anteriormente.

10- Quantificação de Proteínas pelo Método BCA

Os eppendorfs contendo os sobrenadantes coletados de todas as placas utilizadas no experimento foram removidos do congelador e foi aguardado o descongelamento natural.

As 3 novas placas de 96 poços (seguindo o mesmo esquema do experimento conforme Figura 13) foram posicionadas no isopor com gelo. Foi pipetado 25µl de cada eppendorf dentro dos seus poços correspondentes na placa. Foi preparada a solução reagente (proporção 50:1): 12,5ml do reagente A + 250µl do reagente B. Foi colocado

200µl da solução reagente em cada poço. A placa foi embalada em papel alumínio e mantida por 30 minutos em incubadora (37°C). Foi realizada leitura das placas em computador com programa e leitor específicos.