



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA  
- MESTRADO



GIOVANI CERON HARTMANN

Avaliação histológica do capeamento pulpar direto com sericina de seda em  
ratos: um estudo preliminar

Cascavel-PR

2018

GIOVANI CERON HARTMANN

Avaliação histológica do capeamento pulpar direto com sericina de seda em  
ratos: um estudo preliminar

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade estadual do Oeste do Paraná, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Orientador: Prof. Dr. Christian Giampietro  
Brandão

Coorientadora: Prof. Dr<sup>a</sup>. Ana Lúcia Carrinho  
Ayroza Rangel

Cascavel-PR

2018

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)  
(Sistema de Bibliotecas – UNIOESTE)

H265a Hartmann, Giovani Ceron.  
Avaliação histológica do capeamento pulpar direto com sericina de seda em ratos: um estudo preliminar / Giovani Ceron Hartmann. --- Cascavel (PR), 2018.  
40 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Christian Giampietro Brandão  
Coorientadora: Prof. Dr<sup>a</sup>. Ana Lúcia Carrinho Ayroza Rangel.  
Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus de Cascavel, 2018. Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Odontologia.  
Inclui Bibliografia

1. Sericinas. 2. Capeamento da polpa dentária. 3. Hidróxido de Cálcio. 4. Materiais - Testes. I. Brandão, Christian Giampietro. II. Rangel, Ana Lúcia Carrinho Ayroza. III. Universidade Estadual do Oeste do Paraná. IV. Título.

CDD 20.ed. 617.6



**unioeste**

Universidade Estadual do Oeste do Paraná

Campus de Cascavel CNPJ 78680337/0002-65  
Rua Universitária, 2069 - Jardim Universitário - Cx. P. 000711 - CEP 85819-110  
Fone:(45) 3220-3000 - Fax:(45) 3324-4566 - Cascavel - Paraná



**PARANÁ**  
GOVERNO DO ESTADO

### Programa de Pós-Graduação em Odontologia

ATA DA DEFESA PÚBLICA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE GIOVANI CERON HARTMANN, ALUNO(A) DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA DA UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ - UNIOESTE, E DE ACORDO COM A RESOLUÇÃO DO PROGRAMA E O REGIMENTO GERAL DA UNIOESTE.

Ao(s) 18 dia(s) do mês de janeiro de 2018 às 9h00min, no(a) Sala 03 do Instituto de Pesquisa e Pós-Graduação em Odontologia (IPqPGO), realizou-se a sessão pública da Defesa de Dissertação do(a) candidato(a) Giovani Ceron Hartmann, aluno(a) do Programa de Pós-Graduação em Odontologia - nível de Mestrado, na área de concentração em Odontologia. A comissão examinadora da Defesa Pública foi aprovada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Integraram a referida Comissão os(as) Professores(as) Doutores(as): Carlos Augusto Nassar, Christian Giampietro Brandão, Ulisses Xavier da Silva Neto. Os trabalhos foram presididos pelo(a) Christian Giampietro Brandão, orientador(a) do(a) candidato(a). Tendo satisfeito todos os requisitos exigidos pela legislação em vigor, o(a) candidato(a) foi admitido(a) à Defesa de DISSERTAÇÃO DE MESTRADO, intitulada: "Avaliação histológica do capeamento pulpar direto com Sericina de Seda em ratos". O(a) Senhor(a) Presidente declarou abertos os trabalhos, e em seguida, convidou o(a) candidato(a) a discorrer, em linhas gerais, sobre o conteúdo da Dissertação. Feita a explanação, o(a) candidato(a) foi arguido(a) sucessivamente, pelos(as) professores(as) doutores(as): Carlos Augusto Nassar, Ulisses Xavier da Silva Neto. Findas as arguições, o(a) Senhor(a) Presidente suspendeu os trabalhos da sessão pública, a fim de que, em sessão secreta, a Comissão expressasse o seu julgamento sobre a Dissertação. Efetuado o julgamento, o(a) candidato(a) foi **aprovado(a)**. A seguir, o(a) Senhor(a) Presidente reabriu os trabalhos da sessão pública e deu conhecimento do resultado. E, para constar, o(a) Coordenador(a) do Programa de Pós-Graduação em Odontologia, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná - UNIOESTE - Campus de Cascavel, lavra a presente ata, e assina juntamente com os membros da Comissão Examinadora e o(a) candidato(a).

Orientador(a) - Christian Giampietro Brandão  
Universidade Estadual do Oeste do Paraná - Campus de Cascavel (UNIOESTE)

Carlos Augusto Nassar  
Universidade Estadual do Oeste do Paraná - Campus de Cascavel (UNIOESTE)



**unioeste**

Universidade Estadual do Oeste do Paraná

Campus de Cascavel CNPJ 79680337/0002-65  
Rua Universitária, 2069 - Jardim Universitário - Cx. P. 000711 - CEP 85819-110  
Fone: (45) 3220-3000 - Fax: (45) 3324-4566 - Cascavel - Paraná



**PARANÁ**  
GOVERNO DO ESTADO

**Programa de Pós-Graduação em Odontologia**

ATA DA DEFESA PÚBLICA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE GIOVANI CERON HARTMANN, ALUNO(A) DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA DA UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ - UNIOESTE, E DE ACORDO COM A RESOLUÇÃO DO PROGRAMA E O REGIMENTO GERAL DA UNIOESTE.

Ulisses Xavier da Silva Neto  
Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR)

Giovani Ceron Hartmann  
Candidato(a)

Coordenador(a) do Programa de Pós-Graduação em Odontologia

**ADRIANE YAEKO TOGASHI**  
RG: 867.998-63  
Coord. do Programa de  
Pós-Graduação em Odontologia  
Unioeste - CCBS - Campus de Cascavel

## DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Élio e Rosely, são meus exemplos maiores e pessoas que me ensinaram que com trabalho duro e honesto alcançamos nossos objetivos. Meu irmão, Bruno, meu companheiro e amigo mais próximo. E à minha noiva, Cláudia, a menina mais incrível e admirável que já conheci.

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Professor Dr. Christian Giampietro Brandão, que além de excelentíssimo e dedicado mestre, se tornou um amigo. Exemplar como professor e pessoa.

À minha coorientadora, Professora Dr<sup>a</sup>. Ana Lúcia Carrinho Ayroza Rangel, por seus ensinamentos, sua atenção e paciência ao me orientar.

À Professora Dr<sup>a</sup> Rose Meire Costa Brancalhão e à Professora Dr<sup>a</sup> Lucinéia de Fátima Chasko Ribeiro, ambas fundamentais a este trabalho pelo incentivo e amor ao ensinar.

Ao Professor Mauro Carlos Agner Busato pelos ensinamentos e amizade de longa data.

À Marlene, técnica de laboratório hábil, amiga e de grande coração que se tornou minha companheira de cafés da manhã e lanches da tarde.

À Celeste, técnica de laboratório paciente e motivadora.

Ao médico veterinário Fernando, sempre solícito, importantíssimo a este trabalho.

Às dedicadas alunas e colegas do mestrado em Biociências, Bárbara, Ana Luiza e Jéssica, por compartilharem muito conhecimento em laboratório.

Ao Leonardo, Luana e Bárbara, pelo auxílio em várias etapas da pesquisa.

Aos colegas Lúcio Chicarelli e Ana Paula Preczevski, atenciosos e solícitos ao trabalho.

Aos amigos pelo fundamental companheirismo no âmbito acadêmico e fora dele.

Ao Reitor Paulo Sérgio Wolff e ao Programa de Pós-graduação *Stricto Sensu* em Odontologia da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, professores, funcionários e colaboradores.

“A NOSSA MAIOR GLÓRIA NÃO RESIDE NO FATO  
DE NUNCA CAIRMOS, MAS SIM EM LEVANTARMO-  
NOS SEMPRE DEPOIS DE CADA QUEDA.”

Oliver Goldsmith



## Avaliação histológica do capeamento pulpar direto com sericina de seda em ratos: um estudo preliminar

### RESUMO

Este estudo analisou a sericina como potencial biomaterial em contato com a polpa dental comparando histologicamente sua resposta ao capeamento pulpar direto com hidróxido de cálcio. Estes são os primeiros dados morfológicos e funcionais procedentes da aplicação desta proteína diretamente sobre a exposição da polpa. Foram utilizados 20 primeiros molares superiores de ratos Wistar machos, com 60 dias de idade entre 200 e 300 gramas, os quais foram divididos em 4 grupos (n=5): G1 e G3, controles, capeados com hidróxido de cálcio em 7 e 30 dias, respectivamente; G2 e G4, capeados com sericina em 7 e 30 dias, respectivamente. Cavidades circulares foram preparadas para exposição pulpar, onde foram aplicados os materiais capeadores, sendo posteriormente restauradas com cimento de ionômero de vidro. Transcorridos os tempos dos grupos, os animais foram eutanasiados e os molares foram processados histologicamente para análise em microscopia de luz para avaliar presença de necrose no tecido pulpar, infiltração de células inflamatórias e formação de dentina terciária. Aos 7 dias, a necrose e a infiltração de células inflamatórias foram menores em G1 quando comparado ao G2 ( $p=0,007$  e  $p=0,008$ , respectivamente). Aos 30 dias, uma amostra do G3 induziu formação de dentina terciária e G4 apresentou diminuição de inflamação ( $p=0,041$ ) em relação ao G2. Dentro das determinadas condições experimentais, concluiu-se que a sericina não se mostrou viável ao tratamento por não induzir formação de dentina terciária, entretanto, seu contato com o tecido pulpar demonstrou melhora na resposta inflamatória ao longo do tratamento e proliferação de novas células.

**Palavras-chave:** Sericinas, Capeamento da polpa dentária, Hidróxido de Cálcio, Teste de Materiais.

## Histologic evaluation of direct pulp capping with silk sericin in mice: a preliminary study

### *ABSTRACT*

This study analyzed sericin as a potential biomaterial in contact with dentin pulp, histologically comparing its response to direct pulp capping with calcium hydroxide. These are the first morphological and functional data derived from application of this protein directly on pulp exposure. 20 maxillary first molars from Wistar male mice were used, with 60 days of age, between 200 and 300 grams, which were divided in 4 groups (n=5): G1 and G3, controls, capped with calcium hydroxide in 7 and 30 days, respectively; G2 and G4, capped with sericin in 7 and 30 days, respectively. Circular cavities were prepared for pulp exposure, where capping materials were applied, being posteriorly restored with glass ionomer cement. At the end of the groups period, animals were euthanized and molars were histologically processed for analysis in light microscopy to evaluate presence of necrosis in pulp tissue, inflammatory cells infiltration and tertiary dentin formation. After 7 days, there was less necrosis and inflammatory cells infiltration in G1 when compared to G2 ( $p=0.007$  and  $p=0.008$ , respectively). After 30 days, a sample of G3 induced tertiary dentin formation and G4 showed decrease in inflammation ( $p=0.041$ ) compared to G2. Among the determined experiment conditions, it was concluded that sericin did not present to be viable to treatment as it did not induce tertiary dentin formation, although, its contact with pulp tissue has shown improve in inflammatory response during the treatment and new cells proliferation.

**Keywords:** Sericins, Dental pulp capping, Calcium Hydroxide, Materials Testing.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Fotografia da sericina em pó sobre placa de vidro e aplicador de MTA Angelus de 0,6 mm de diâmetro.....	19
Figura 2 – Fotografia da mesa operatória para imobilização e manutenção da abertura bucal do animal.....	20
Figura 3 – Imagens da sequência do procedimento. A: Preparo da cavidade do primeiro molar superior; B: Controle da hemorragia com cone de papel; C: Inserção do material com aplicador de MTA Angelus; D: Selamento com Ketac molar Easymix.....	21
Figura 4 - Fotomicrografias representativas dos grupos estudados.....	26
Figura 5 – Fotomicrografia representativa da formação de dentina terciária parcial por mais da metade do local da exposição em G3 (HE, 400x).....	27

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Grupos de animais e material utilizado em cada grupo.....	18
Tabela 2 - Escores utilizados para presença de necrose no tecido pulpar.....	22
Tabela 3 - Escores utilizados para infiltração de células inflamatórias.....	22
Tabela 4 - Escores utilizados para formação de dentina terciária.....	23
Tabela 5 - Análise estatística da presença de necrose no tecido pulpar para os materiais avaliados (mediana $\pm$ desvio interquartílico).....	25
Tabela 6 - Análise estatística da infiltração de células inflamatórias para os materiais avaliados (mediana $\pm$ desvio interquartílico).....	25
Tabela 7 - Análise estatística da formação de dentina terciária para os materiais avaliados (mediana $\pm$ desvio interquartílico).....	26

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µm - micrômetro

°C - Grau ou graus Celsius

CEUA - Comitê de Ética em Uso Animal

COBEA - Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

cm - centímetro

cm<sup>2</sup> - centímetro quadrado

Dr. - Doutor

Dr<sup>a</sup>. - Doutora

Fig. - Figura

g - gramas

G1 - Grupo 1

G2 - Grupo 2

G3 - Grupo 3

G4 - Grupo 4

HE - Hematoxilina e Eosina

IL-1β – Interleucina Um Beta

kDa - Quilodalton

Kgf - Quilograma-força

Ltda - Limitada

n - Número

mL - Mililitros

mm - Milímetros

MTA - Agregado de Trióxido Mineral

P.A. - Pró-análise

PR - Paraná

Prof. - Professor

RPM - Rotação por minuto

Tab. – Tabela

TCA - Ácido Tricloroacético

TNF-α – Fator de Necrose Tumoral Alfa

Unioeste - Universidade Estadual do Oeste do Paraná

x - Vezes

Dissertação elaborada e formatada conforme  
as normas das publicações científicas:  
*Brazilian Dental Journal*. Disponível em:  
<http://www.scielo.br/revistas/bdj/iinstruc.htm>

## SUMÁRIO

Introdução .....	16
Metodologia .....	18
Resultados .....	24
Discussão.....	28
Referências Bibliográficas .....	31
Anexos.....	34

## **ARTIGO CIENTÍFICO**

### **AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DO CAPEAMENTO PULPAR DIRETO COM SERICINA DE SEDA EM RATOS: UM ESTUDO PRELIMINAR**

Autores: Giovani Ceron Hartmann  
Rose Meire Costa Brancalhão  
Lucinéia de Fátima Chasko Ribeiro  
Ana Lúcia Carrinho Ayroza Rangel  
Christian Giampietro Brandão

#### **PALAVRAS CHAVE:**

Sericinas, Capeamento da polpa dentária, Hidróxido de Cálcio, Teste de Materiais



## Introdução

A vitalidade da polpa dental é de grande importância para os dentes, não apenas para fornecer nutrição, mas também como sensores biológicos para detectar estímulos externos. A preservação da vitalidade da polpa, quando possível, deve ser sempre o objetivo essencial do tratamento restaurador. O capeamento pulpar direto é um método viável e válido para isolar a estimulação externa e pode trazer um excelente resultado (1,2).

A exposição da polpa vital pode ser causada por cáries, fontes mecânicas e trauma. Se ocorrer exposição à polpa antes que a cárie seja completamente removida, é considerada exposição por cárie. Se a exposição à polpa ocorrer durante a preparação de uma cavidade sem cáries, é chamada de mecânica, e geralmente ocorrem devido a falhas na preparação dos dentes. A exposição traumática à polpa pode resultar de uma lesão durante alguma atividade, como a prática esportiva, quando a parte coronal do dente está fraturada. Diante de uma exposição em polpa vital, o capeamento pulpar direto, pulpotomia ou a pulpectomia podem ser opções de tratamento (3).

Originalmente, a cicatrização da polpa exposta ocorre pela formação de uma nova barreira de dentina sob a exposição, sendo o hidróxido de cálcio capaz de realizar esta ação em cerca de três ou quatro semanas. Em contrapartida, sabe-se que o efeito inicial do hidróxido de cálcio sobre a polpa é destrutivo, produzindo lesões químicas causadas pelo pH alcalino (alta concentração de íons hidroxila), levando à necrose da polpa (4). Neste sentido, a busca de substâncias biocompatíveis que minimizem ou mesmo não causem maiores agressões teciduais durante o capeamento pulpar representariam um ganho científico na área.

Estudos recentes indicam que substâncias naturais como a sericina obtida de casulos do bicho-da-seda têm sido utilizadas como biomateriais no processo de cicatrização tecidual, tanto na forma pura quanto modificada, e mesmo sua combinação com outros materiais, o que resulta em uma grande variedade de formas de aplicação (5-9).

A sericina é uma proteína altamente hidrofílica com peso molecular que varia de 20 a 400 kDa e é composta por 18 aminoácidos, incluindo os essenciais. Os grupos polares (carboxila, hidroxila e grupos amina) de cadeias laterais de aminoácidos e sua composição orgânica, solubilidade e organização estrutural permitem ligações cruzadas, copolimerizações e combinações com outros polímeros, que juntos conferem propriedades antioxidante, hidratante, cicatrizante, antibacteriana e antimicrobiana, antirradiação ultravioleta e antitumoral à sericina (10-12).

De acordo com Lamboni et al. (6), a incorporação de sericina na reparação da pele e materiais de cicatrização de feridas causa uma maior adesão, migração e crescimento de fibroblastos e queratinócitos; ainda, promove aumento na produção de colágeno e reepitelização em feridas na pele. Em relação à sua ação sobre tecido conjuntivo, como a polpa dentária, Xie et al. (7) relataram que o uso da sericina em nervo ciático de ratos permite recuperação funcional comparável à do enxerto de nervo autólogo, demonstrando função e morfologia nervosa drasticamente melhoradas.

Observando a potencial aplicação da sericina em medicina regenerativa, curativa e engenharia tecidual (6,7,13-16), esta proteína da seda se apresenta de grande interesse na odontologia, principalmente em um procedimento como o capeamento pulpar direto, por se tratar de um contato direto do material com tecido conjuntivo, podendo oferecer uma alternativa eficaz e valiosa a esta técnica.

Com base nessas considerações, é oportuno analisar a sericina como potencial biomaterial em contato com a polpa dental, comparando histologicamente sua resposta ao capeamento pulpar direto de ratos com hidróxido de cálcio, de maneira que seja possível avaliar a presença de necrose no tecido pulpar, infiltração de células inflamatórias e formação de dentina terciária em dois períodos de tempo: 7 e 30 dias.

## Metodologia

### Aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA)

Os procedimentos experimentais deste trabalho estão de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foram analisados e aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual do Oeste do Paraná pelo protocolo nº 60/17.

### Animais

Foram utilizados 20 primeiros molares superiores de ratos (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar), machos, com 60 dias de idade e entre 200 e 300 gramas mantidos em ambiente controlado, ciclo claro-escuro de 12 horas, temperatura ambiente de  $21 \pm 1$  °C, água e ração pastosa *ad libitum*. Esses molares foram avaliados histologicamente em dois períodos de tempo: 7 e 30 dias e distribuídos equitativa e aleatoriamente em 4 (quatro) grupos (n=5), sendo estes: G1 (controle): Hidróxido de Cálcio P.A. em 7 dias; G2: Sericina de seda em 7 dias; G3 (controle): Hidróxido de Cálcio P.A. em 30 dias; G4: Sericina de seda em 30 dias (Tab. 1).

**Tabela 1** - Grupos de animais e material utilizado em cada grupo.

Grupos	Materiais	Dentes	Eutanásia
G1	Hidróxido de Cálcio (controle)	5	7 dias
G2	Sericina de seda	5	7 dias
G3	Hidróxido Cálcio (controle)	5	30 dias
G4	Sericina de seda	5	30 dias

### Preparo da Sericina

A proteína sericina foi extraída de casulos do bicho-da-seda (*Bombyx mori*), obtidos da empresa sericícola BRATAC Silk do Brasil® (Londrina, Paraná, Brasil). Os casulos foram

cortados em pedaços pequenos (cerca de 1 cm<sup>2</sup>) e o equivalente a 6 g de casulo picado foi imerso em 100 mL de água destilada num Erlenmeyer de 500 mL. A solução foi autoclavada, (autoclave CS 30 – Primatec) a 120 °C e pressão de 1 kgf/cm<sup>2</sup>, por 60 minutos. O extrato bruto obtido foi filtrado, em peneira com 18 malhas, para separação/remoção da fibroína, onde se obteve um hidrolisado de sericina. Este protocolo foi baseado nos estudos de Gimenes et al. (17) que utilizam a água, sem qualquer aditivo químico, para a extração da sericina. O hidrolisado de sericina foi congelado e liofilizado (Liofilizador LT 1000, Terroni Equipamentos Ltda<sup>®</sup>), por aproximadamente 54 horas, sendo obtida a sericina em pó, armazenada em temperatura ambiente até sua utilização (Fig. 1).

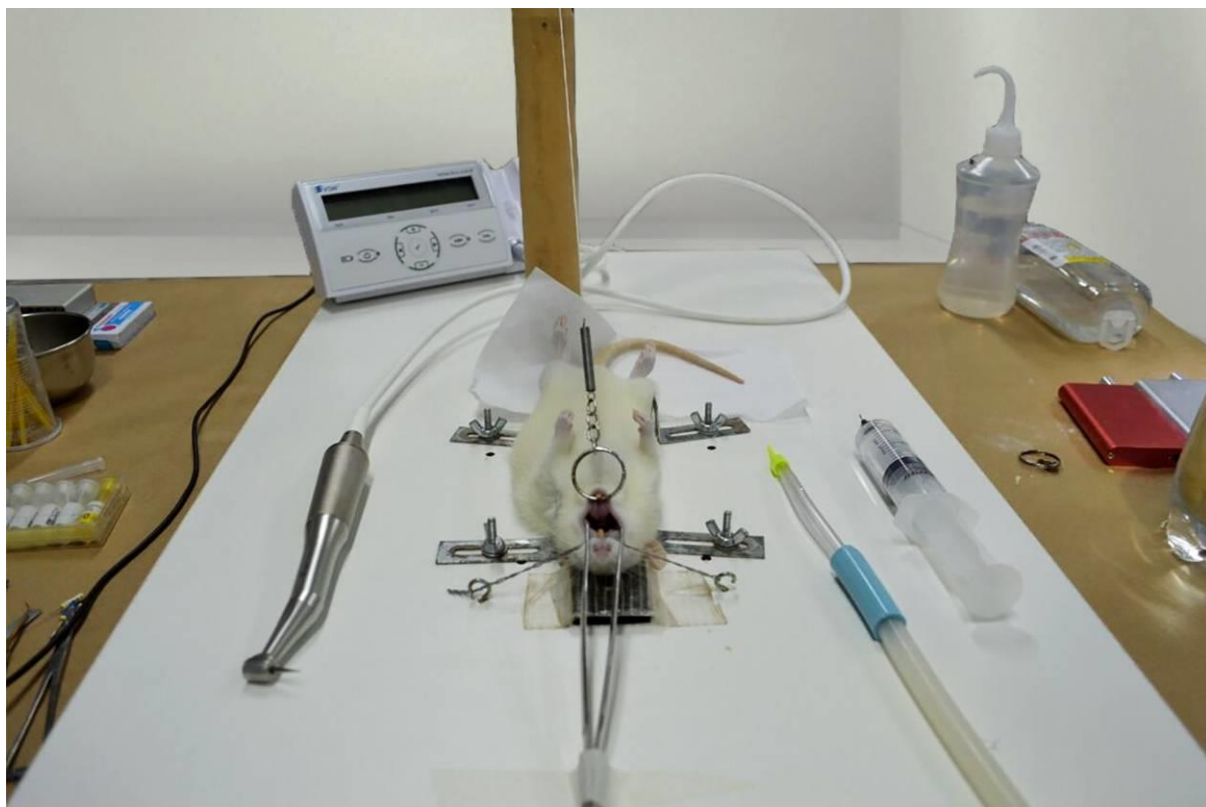


**Figura 1** – Fotografia da sericina em pó sobre placa de vidro e aplicador de MTA Angelus de 0,6 mm de diâmetro.

#### Capeamento pulpar direto

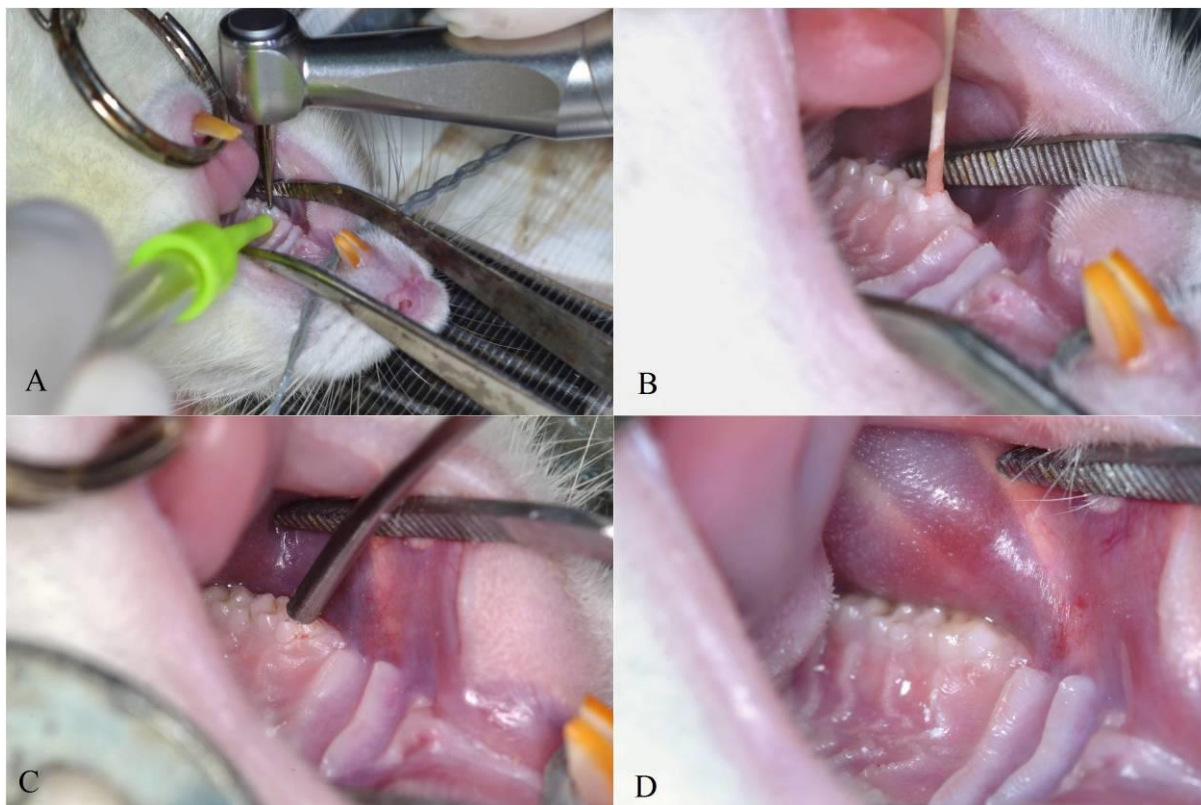
Os animais foram pesados anteriormente e anestesiados com uma combinação de quetamina 10% 0,1 mL/100 g de peso (Dopalen injetável<sup>®</sup>, Ceva Saúde Animal, Paulínia, SP, Brasil) e xilazina 2% 0,05 mL/100 g de peso (Anasedan injetável<sup>®</sup>, Ceva Saúde Animal, Paulínia, SP, Brasil), por meio de uma injeção intraperitoneal e posicionados em mesa

operatória apropriada (18), a qual permite a manutenção da abertura bucal dos animais, facilitando o acesso aos dentes da região da maxila (Fig. 2).



**Figura 2** – Fotografia da mesa operatória para imobilização e manutenção da abertura bucal do animal.

Nos primeiros molares superiores foram preparadas cavidades circulares na face oclusal sobre a fossa central mesial dos dentes, com auxílio de motor endodôntico VDW Silver (VDW<sup>®</sup>, Munique, Alemanha) a 400 RPM com fresa diamantada ¼ (KG Sorensen Ind & Com<sup>®</sup>, Alphaville, São Paulo, Brasil) sob irrigação de soro fisiológico até obter sangramento, a hemorragia pulpar foi controlada e a cavidade seca com cones de papel absorventes esterilizados [adaptado de Shinkai et al. 2017 (19)]. Os materiais foram aplicados utilizando dispositivo metálico Aplicador de MTA Angelus de 0,6 mm de diâmetro (Angelus<sup>®</sup>, Londrina, PR, Brasil) e as cavidades foram seladas por cimento de ionômero de vidro Ketac Molar Easymix (3M ESPE<sup>®</sup>, São Paulo-SP, Brasil) (Fig. 3).



**Figura 3** – Imagens da sequência do procedimento. A: Preparo da cavidade do primeiro molar superior; B: Controle da hemorragia com cone de papel; C: Inserção do material com aplicador de MTA Angelus; D: Selamento com Ketac molar Easymix.

#### Obtenção das amostras

Os animais foram eutanasiados com 7 e 30 dias após capeamento pulpar e esta foi realizada por sobredose dos mesmos anestésicos utilizados no procedimento operatório, porém em concentrações diferentes (dose quatro vezes maior por animal). As maxilas foram removidas e devidamente nominadas, acondicionadas em recipientes de vidro e fixadas em solução de formol a 10% durante 48 horas e posteriormente em álcool 70% durante 15 dias.

#### Processamento Histológico

As hemimaxilas foram descalcificadas com ácido tricloroacético (TCA) 5% em temperatura ambiente por 20 dias. As peças foram avaliadas para verificar o grau de descalcificação esperado, com renovação da solução de TCA a cada 5 dias. Após a descalcificação, as peças foram lavadas em água corrente e submetidas ao processamento histológico automático (Processador automático de tecidos, Leica Microsystems TP1020<sup>®</sup>, Nussloch, Alemanha). A seguir, foi realizada a inclusão das peças e obtenção de blocos de

parafina (Parafina Purificada, Vetec Química Fina<sup>®</sup>, RJ, Brasil). Estes blocos foram cortados em micrótomo semiautomático (Hestion<sup>®</sup>, ERM3000, Daintree Scientific, St. Helens, Austrália) para obtenção de secções de 5 µm de espessura. Os cortes foram selecionados de acordo com a região de exposição e montados em lâminas histológicas coradas pela técnica histoquímica de Hematoxilina e Eosina.

### Análise Histológica

As análises histológicas foram realizadas por dois observadores previamente treinados, de forma cega, utilizando aumento de 40x, 100x e 400x (Microscópio Óptico Leica Microsystems<sup>®</sup> ICC50HD, Nussloch, Alemanha) e sistema de captura de imagens (Las Ez – Leica<sup>®</sup>, versão 2.10, 2012). Foi realizada análise descritiva das lâminas e analisados os seguintes parâmetros: presença de necrose no tecido pulpar, infiltração de células inflamatórias e formação de dentina terciária, os quais foram classificados por escores e encontram-se descritos nas tabelas 2, 3 e 4 [adaptado de Suzuki et al. (20)].

**Tabela 2** - Escores utilizados para presença de necrose do tecido pulpar.

Escores	Necrose do tecido pulpar
0	Ausência de necrose;
1	Presença de necrose no terço coronário da polpa;
2	Presença de necrose no terço coronário e médio;
3	Presença de necrose em toda a polpa.

**Tabela 3** - Escores utilizados para infiltração de células inflamatórias.

Escores	Infiltração de células inflamatórias
0	Ausência ou presença ocasional de células inflamatórias na polpa (nenhum);
1	Inflamação leve aguda/crônica (leve);
2	Reações inflamatórias como microabscessos ou infiltrados de leucócitos polimorfonucleares, histiócitos e linfócitos envolvendo a polpa coronária até metade da polpa radicular (moderada);
3	Reação inflamatória envolvendo a totalidade do tecido pulpar (grave);
4	Impossível avaliação das células inflamatórias por degeneração necrótica.

**Tabela 4** - Escores utilizados para formação de dentina terciária.

Escores	Formação de dentina terciária
0	Formação completa de ponte de dentina (completo);
1	Formação de ponte de dentina parcial/incompleta que se estende a mais de metade do local de exposição, mas não fecha completamente a região da exposição (parcial);
2	Formação de ponte de dentina inicial estendendo-se não mais do que metade do local de exposição (inicial);
3	Sem formação de ponte de dentina (nenhum).

### Análise Estatística

Para a avaliação das variáveis deste estudo, todos os escores foram expressos como mediana  $\pm$  desvio interquartil. As comparações histológicas e o cálculo da amostra foram baseadas no estudo de Shinkai et al. 2017 (19) e realizadas através do programa BioStat 5.3 (Instituto Mamirauá, Belém, Pará, Brasil), sendo utilizados os testes de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn, com nível de significância de 95%. Além disso, foi utilizado o menor número possível de animais por grupo, por proteção animal.



## Resultados

### Avaliação do sétimo dia

Em resposta ao hidróxido de cálcio ao sétimo dia (G1) foi possível observar que a porção superficial da camada odontoblástica e células adjacentes da polpa coronária encontravam-se ausentes em decorrência do trauma mecânico no ato da exposição pulpar. Além disso, notou-se necrose no tecido pulpar no terço cervical da polpa em 80% das amostras e infiltrado inflamatório agudo moderado envolvendo a polpa coronária até metade da polpa radicular, representado por áreas de exsudação neutrofílica. Abaixo, o tecido pulpar apresentou celularidade moderada com fibroblastos, tecido de granulação e hiperemia na maioria das amostras analisadas (Fig. 4A).

Já a resposta pulpar à sericina em 7 dias (G2) demonstrou degeneração por necrose envolvendo toda a polpa coronária e radicular em 80% dos casos, impossibilitando a análise morfológica qualitativa de outros parâmetros (Fig. 4B). Como pode ser observado nas tabelas 5 e 6 respectivamente, o G1 apresentou melhor escore na comparação com G2, quanto ao grau de necrose no tecido pulpar ( $p=0,007$ ) e quanto à presença de infiltração de células inflamatórias ( $p=0,008$ ). Em relação à formação de dentina terciária aos 7 dias, não houve formação de barreira de dentina em todos os casos, independente do material utilizado, sem diferença estatística entre os grupos para esse critério ( $p>0,05$ ).

### Avaliação do trigésimo dia

Aos 30 dias observou-se presença de necrose predominantemente no terço coronário, médio e apical do tecido pulpar para o grupo com hidróxido de cálcio (G3). Em relação à sericina (G4), a presença de necrose foi observada principalmente no terço coronário e médio da polpa. Subjacente à necrose, para ambos os grupos, foi observado infiltrado inflamatório crônico moderado e, em alguns casos, extenso, caracterizado predominantemente por leucócitos mononucleares, como linfócitos e macrófagos. Em relação à formação de dentina terciária, em apenas uma amostra do G3, foi possível verificar capacidade de formação de barreira de dentina atubular, parcial, por mais da metade do local da exposição (Fig. 4C e 5), enquanto o G4 não apresentou formação de qualquer barreira de dentina terciária (Fig. 4D). Na comparação entre os grupos não houve diferença estatisticamente significativa para os três critérios de avaliação ( $p>0,05$ ).

### Comparação entre 7 e 30 dias

Quanto à ocorrência de necrose pulpar nos grupos submetidos ao tratamento por hidróxido de cálcio (G1 e G3), foi possível observar que o tempo de permanência do produto foi fator agravante quanto a sua extensão ( $p=0,010$ ), visto que em 30 dias a área pulpar envolvida por necrose mostrou-se maior (Tab. 5). Já quanto à infiltração de células inflamatórias nos mesmos grupos, houve também maior grau de inflamação ( $p=0,012$ ) após 30 dias (Tab. 6). Quanto à formação de dentina terciária, o hidróxido de cálcio induziu a formação de barreira de dentina em 20% das amostras em 30 dias, porém, a comparação entre os tempos dos materiais não demonstraram diferença estatística entre os grupos (Tab. 7). A sericina teve diminuição nos níveis de inflamação após 30 dias de tratamento ( $p=0,041$ ), entretanto, não apresentou histologicamente indícios de formação de material mineralizado. A sericina não demonstrou diferença estatisticamente significativa entre 7 e 30 dias em relação a necrose no tecido pulpar e formação de dentina terciária ( $p>0,05$ ).

**Tabela 5** – Análise estatística da presença de necrose no tecido pulpar para os materiais avaliados (mediana  $\pm$  desvio interquartílico).

<i>Material/Tempo</i>	<i>7 dias</i>	<i>30 dias</i>
Hidróxido de Cálcio	1 $\pm$ 0.0 Aa	3 $\pm$ 1.0 Ab
Sericina	3 $\pm$ 0.0 Ba	2 $\pm$ 1.0 Aa

Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna significam diferenças estatisticamente significantes,  $p<0,05$ .  
Letras minúsculas diferentes na mesma linha significam diferenças estatisticamente significantes,  $p<0,05$ .

**Tabela 6** - Análise estatística da infiltração de células inflamatórias para os materiais avaliados (mediana  $\pm$  desvio interquartílico).

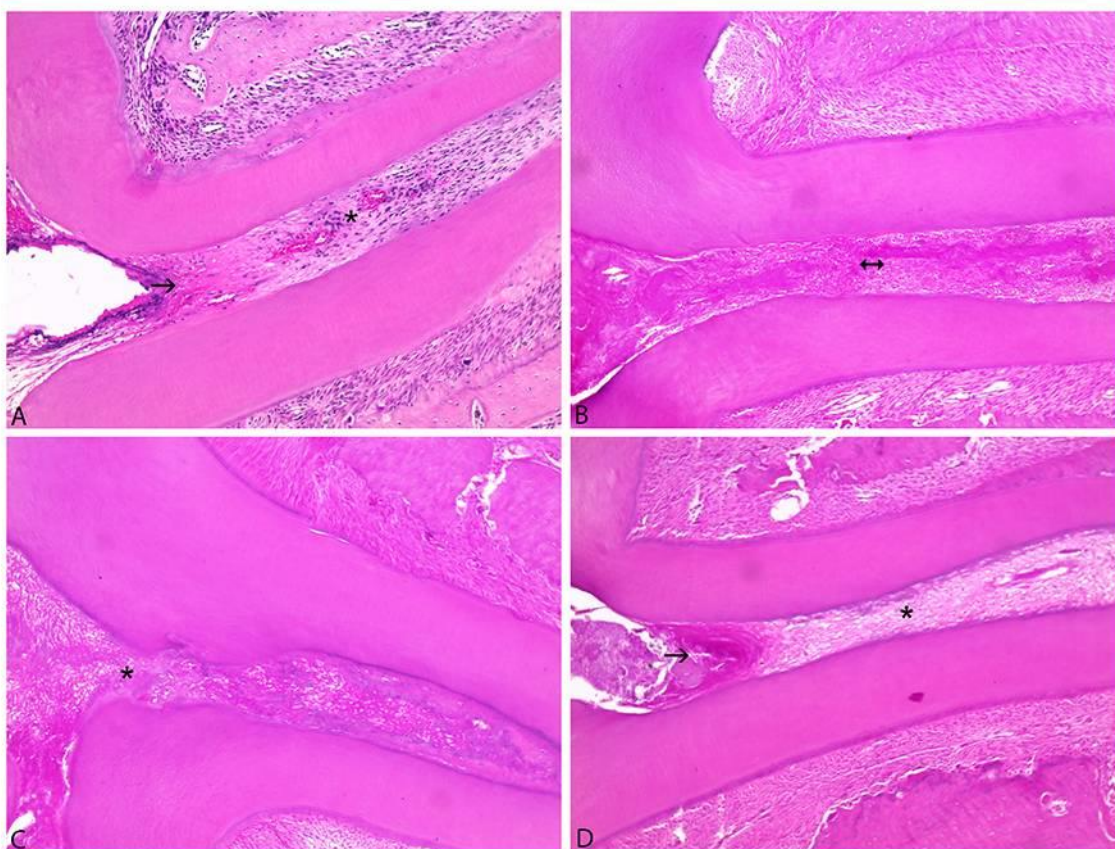
<i>Material/Tempo</i>	<i>7 dias</i>	<i>30 dias</i>
Hidróxido de Cálcio	2 $\pm$ 0.0 Aa	4 $\pm$ 1.0 Ab
Sericina	4 $\pm$ 0.0 Bb	2 $\pm$ 1.0 Aa

Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna significam diferenças estatisticamente significantes,  $p<0,05$ .  
Letras minúsculas diferentes na mesma linha significam diferenças estatisticamente significantes,  $p<0,05$ .

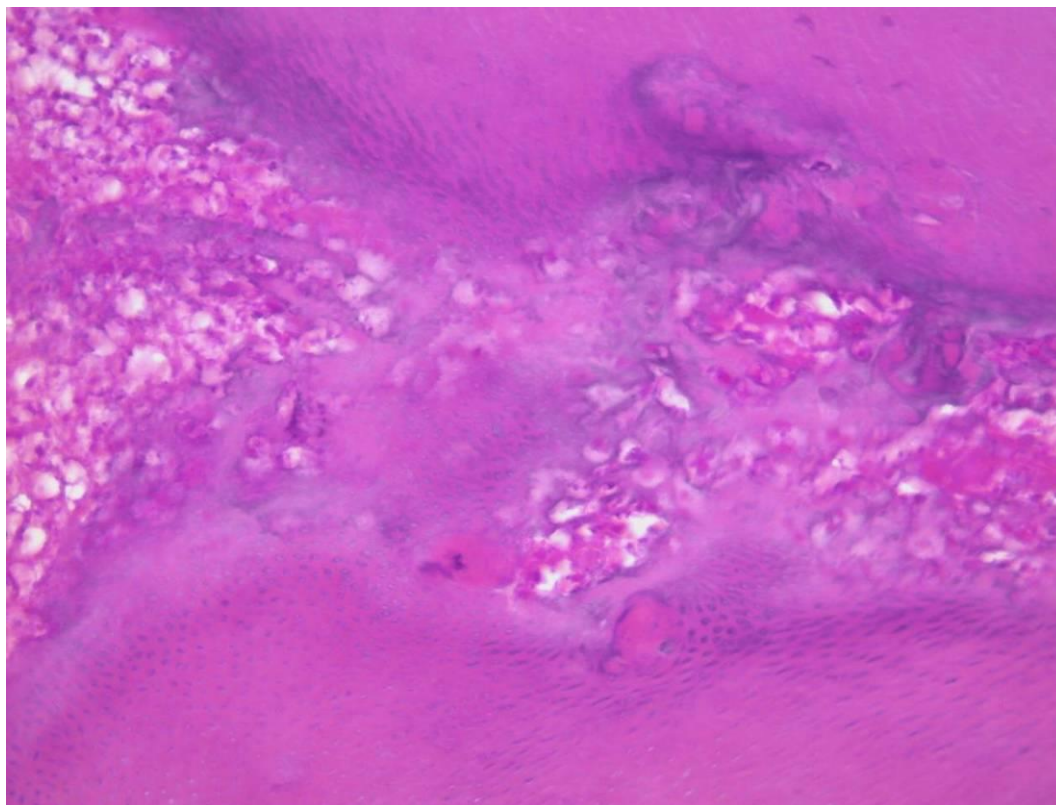
**Tabela 7** - Análise estatística da formação de dentina terciária para os materiais avaliados (mediana  $\pm$  desvio interquartílico).

<i>Material/Tempo</i>	<i>7 dias</i>	<i>30 dias</i>
Hidróxido de Cálcio	3 $\pm$ 0.0 Aa	3 $\pm$ 0.0 Aa
Sericina	3 $\pm$ 0.0 Aa	3 $\pm$ 0.0 Aa

Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna significam diferenças estatisticamente significantes,  $p < 0,05$ .  
Letras minúsculas diferentes na mesma linha significam diferenças estatisticamente significantes,  $p < 0,05$ .



**Figura 4** - Fotomicrografias representativas dos grupos estudados. A, G1: Observa-se necrose superficial do terço coronário da polpa radicular (seta) enquanto no restante da polpa radicular é possível observar hiperemia e um grau leve de inflamação, predominantemente crônico (asterisco); B, G2: Nota-se que a totalidade da polpa radicular está necrótica (seta bidirecional), impossibilitando a avaliação de outros parâmetros propostos para a condição pulpar; C, G3: Observa-se a formação de dentina terciária descontínua no terço coronário da polpa radicular (asterisco); D, G4: Evidencia-se necrose superficial do terço coronário da polpa radicular (seta) e ausência de formação de material mineralizado enquanto no restante é possível observar desorganização completa da polpa radicular (asterisco); (HE, 100x).



**Figura 5** – Fotomicrografia representativa da formação de dentina terciária parcial por mais da metade do local da exposição em G3 (HE, 400x).

## Discussão

A expectativa do potencial uso da sericina como biomaterial em odontologia, seja como complemento ou mesmo como uma nova alternativa no capeamento pulpar direto, baseia-se na observação dos resultados da aplicação deste biomaterial em outros tecidos, onde mostrou-se bastante promissora (5-9,12). Considerando que ainda não há estudos utilizando esta proteína para tal finalidade, estes são os primeiros dados morfológicos e funcionais procedentes da aplicação da sericina diretamente sobre polpa dental exposta.

Neste estudo, o tratamento da exposição pulpar com sericina liofilizada na forma pura evidenciou sua capacidade pró-inflamatória na resposta inicial, como observado na tabela 6, além de demonstrar ser mais agressivo ao tecido pulpar aos 7 dias de tratamento quando comparada ao hidróxido de cálcio (Tab. 5). Em contrapartida, a resposta inflamatória diminuiu após 30 dias, fato que pode ser comparado ao estudo de Aramwit et al. (12) que investigaram que o processo de cicatrização de feridas apresentou melhora de tratamento após o uso da sericina, demonstrando que os mediadores inflamatórios TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , quando foi realizado o experimento com a sericina, se mostraram significativamente menores.

A resposta inicial agressiva pode se dar ao fato que, no presente estudo, o material restaurador foi aplicado na dentina sem qualquer tratamento na superfície dental, desta forma, sua ligação ficou restrita à resistência coesiva da *smear layer* que não foi removida, limitando, assim, o contato necessário para adesão entre o material restaurador (ionômero de vidro) e o tecido dentinário. Esta adesão não ideal, aliada à porosidade do material capeador, pode ter contribuído para um aumento na extensão e intensidade de necrose e inflamação, respectivamente.

Além da adesão, um importante fator que deve ser observado neste estudo é a própria utilização do cimento de ionômero de vidro como material restaurador sobre o capeamento, fazendo-se questionar se ele pode ter influenciado no índice de inflamação intensa nos grupos. Esse material restaurador possui propriedades ácidas e cáusticas (21) e, devido às cavidades serem de um tamanho minimamente invasivo, torna-se impossível a aplicação de uma base seladora. Assim, o cimento de ionômero de vidro pode ter causado uma injúria adicional para a polpa causando uma resposta inflamatória exacerbada.

Durante muitos anos, a importância da inflamação na cicatrização pulpar foi subestimada, sendo considerada apenas como um efeito indesejável. Entretanto, existem evidências de que a inflamação é um pré-requisito para cicatrização de tecidos e regeneração da polpa. Células imunocompetentes (monócitos, macrófagos e células tronco) são recrutadas

e deslizam ao longo da raiz e migram para a coroa. Devido à alta alcalinidade do agente capeador, a mineralização é iniciada e torna-se mais espessa, enquanto processos inflamatórios induzem proliferação de células de polpa, apresentando células de maior número e tamanho (22).

Corroborando com o estudo de Aramwit et al. (5) e Ersel et al. (8), onde a sericina acelerou a regeneração de tecidos cutâneos e favoreceu a proliferação de novas células, seu contato com a polpa dental neste estudo, apesar de não ter sido capaz de induzir a formação de dentina terciária e não sugerir interação com os odontoblastos, apresentou menor grau de infiltração de células inflamatórias após 30 dias de tratamento quando comparado à sua resposta inicial, demonstrando melhora durante o tratamento e indicando uma resposta reparadora (Tab. 6). Por não ter formado dentina terciária, a sericina liofilizada aplicada de forma pura não demonstrou interação direta com odontoblastos, porém sugere-se que se for associada a algum material que induza formação de tecido duro mineralizado, ela pode contribuir na melhora da resposta inflamatória.

Apesar do seu potencial, a sericina pura forma filamentos frágeis e torna-se difícil usá-las como um biomaterial em engenharia de tecidos (23). Por essa razão, diferentes estratégias têm sido aplicadas para aumentar as propriedades físicas da sericina (6). Além disso, o tamanho da cavidade realizada no dente do animal, bem como a extensão da exposição da polpa, limita a eficiência da inserção e assentamento do material na região desejada.

Em relação ao hidróxido de cálcio, seu efeito no capeamento pulpar é considerado o resultado da lesão química causada pela liberação dos íons hidroxila. Inicialmente, o hidróxido de cálcio aplicado à polpa exposta causa o desenvolvimento de uma necrose superficial e causa ligeira irritação devido ao seu pH alcalino, estimulando a polpa a se defender e realizar reparação do tecido para formar uma ponte de dentina reparadora através da diferenciação celular, secreção de matriz extracelular e posterior mineralização (24).

O hidróxido de cálcio é um material que possui uma longa história de uso clínico, sendo o padrão ouro para esta finalidade durante muitos anos, sendo, ainda, amplamente utilizado para a cobertura direta da polpa exposta (20).

Neste estudo, o capeamento pulpar direto realizado com hidróxido de cálcio apresentou aumento considerável na incidência de necrose e inflamação pulpar após 30 dias de tratamento quando comparados à resposta inicial, em 7 dias, além de mostrar capacidade de formação de dentina terciária. Este resultado mostrou-se similar ao estudo descrito por Tran et al. (25), que observaram uma camada necrótica persistente em todos os grupos testados com hidróxido de cálcio na proximidade do local de exposição e capacidade de

formação de barreira mineralizada de dentina sob o material capeador por vezes incompleta e predominantemente porosa.

A formação de dentina terciária diante do capeamento pulpar com hidróxido de cálcio após 30 dias foi observada em apenas 20% das amostras. Essa taxa pode não ter sido mais expressiva devido ao longo tempo de ação do hidróxido de cálcio sobre a polpa, além do número reduzido de amostras, já que se trata de um material consolidado na prática odontológica. Ainda assim, este resultado demonstra capacidade de reparo sob ação do hidróxido de cálcio, como já observado em diversos estudos de natureza similar (20,21,24).

De acordo com os resultados obtidos foi possível concluir que a sericina aplicada de forma pura não se mostrou viável ao tratamento pelo fato de não induzir formação de dentina terciária. Entretanto, seu contato com o tecido pulpar demonstrou melhora na resposta inflamatória ao longo do tratamento e proliferação de novas células. Quando comparada ao hidróxido de cálcio, a resposta inicial da sericina ao tratamento apresentou maior grau de necrose e infiltração de células inflamatórias, diminuindo após 30 dias. Dessa maneira, devido às características promissoras da sericina, mais pesquisas devem ser realizadas, associando-a com outros biomateriais semelhantes, ou com materiais já comercializados para o capeamento pulpar.

## Referências bibliográficas

1. Baume LJ, Holz J. Long term clinical assessment of direct pulp capping. *International dental journal* 1981; 31(4):251–60.
2. Raedel M, Hartmann A, Bohm S, Konstantinidis I, Priess HW, Walter MH. Outcomes of direct pulp capping: interrogating an insurance database. *International Endodontic Journal* 2016; 49(11):1040-1047.
3. Komabayashi T, Ahu Q, Eberhart R, Imai Y. Current status of direct pulp-capping materials for permanent teeth. *Dent Mater J* 2016; 35(1):1-12.
4. Glass RL, Zander HA. Pulp healing. *J Dent Res* 1949; 28(2):97-107.
5. Aramwit P, Palapinyo S, Srichana T, Chottanapund S, Muangman P. Silk sericin ameliorates wound healing and its clinical efficacy in burns wounds. *Arch Dermatol Res* 2013; 305:585–594.
6. Lamboni L, Gauthier M, Yang G, Wang Q. Silk sericin: A versatile material for tissue engineering and drug delivery. *Biotechnology Advances* 2015; 33:1855–1867.
7. Xie H, Yang W, Chen J, Zhang J, Lu X, Zhao X, et al. A Silk Sericin/Silicone Nerve Guidance Conduit Promotes Regeneration of a Transected Sciatic Nerve. *Adv. Healthcare Mater* 2015; 4:2195–2205.
8. Ersel M, Uyanikgil Y, Akarca FK, Ozcete E, Altunci YA, Karabey F et al. Effects of Silk Sericin on Incision Wound Healing in a Dorsal Skin Flap Wound Healing Rat Model. *Med Sci Monit* 2016; 22:1064-1078.
9. Nagai N, Ogata F, Deguchi S, Ueno A, Kawasaki N, Ito Y. Combination Ointment Containing Solid Tranilast Nanoparticles and Dissolved Sericin Is Efficacious for Treating Skin Wound-Healing Deficits and Redness in Diabetic Rats. *Biol Pharm Bull* 2017; 40:444-450.
10. Kato N, Sato S, Yamanaka A, Yamada H, Fuwa N, Nomura M. Silk protein, sericin, inhibits lipid peroxidation and tyrosinase activity. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 1998; 62(1):145–147.
11. Wu JH, Wang Z, Xu SY. Preparation and characterization of sericin powder extracted from silk industry wastewater. *Food Chemistry* 2007; 103(4):1255–1262.
12. Aramwit P, Kanokpanont S, De-Eknamkul W, Srichana T. Monitoring of inflammatory mediators induced by silk sericin. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 2009; 107:556–561.



13. Siritientong T, Aramwit P. Characteristics of carboxymethyl cellulose/sericin hydrogels and the influence of molecular weight of carboxymethyl cellulose. *Macromolecular Research* 2015; 23(9):861–866.
14. Jo YN, Um IC. Effects of solvent on the solution properties, structural characteristics and properties of silk sericin. *International Journal of Biological Macromolecules* 2015; 78:287–295.
15. Lee JH, Song DW, Park YW, Um IC. Effect of residual sericin on the structural characteristics and properties of regenerated silk films. *International Journal of Biological Macromolecules* 2016; 89:273–278.
16. Ramesan MT, Athira VK, Jayakrishnan P, Gopinathan C. Preparation, characterization, electrical and antibacterial properties of sericin/poly(vinyl alcohol)/poly(vinyl pyrrolidone) composites. *Journal of Applied Polymer Science* 2016; 133(24):10 pages.
17. Gimenes ML, Silva VR, Vieira MGA, Da Silva MGC, Scheer AP. High molecular sericin from *Bombyx mori* cocoons: extraction and recovering by ultrafiltration. *International Journal of Chemical Engineering and Applications* 2014; 5(3):266–271.
18. Kirschneck C, Proff P, Fanghaenel J, Behr M, Wahlmann U, Roemer P. Differentiated analysis of orthodontic tooth movement in rats an improved rat model and three-dimensional imaging. *Annals of Anatomy* 2013; 195:539-553.
19. Shinkai K, Taira Y, Kawashima S, Suzuki S, Suzuki M. Histological evaluation of direct pulp capping with all-in-one adhesives in rat teeth. *Dental Materials Journal* 2017; 36(3):348-356.
20. Suzuki M, Taira Y, Kato C, Shinkai K, Katoh Y. Histological evaluation of direct pulp capping of rat pulp with experimentally developed low-viscosity adhesives containing reparative dentin-promoting agents. *Journal of Dentistry* 2016; 44:27-36.
21. Tziafa C, Kolinotou-Kompia E, Papadimitriou S, Tziafas D. Dentinogenic Activity of Biodentine in Deep Cavities os Miniature Swine Teeth. *J Endod* 2015; 41(7): 1161-1166.
22. Goldberg M, Njeh A, Uzunoglu E. Is Pulp Inflammation a Prerequisite for Pulp Healing and Regeneration? *Mediators of Inflammation* 2015; 2015:11 pages.
23. Mandal BB, Priya AS, Kundu SC. Novel silk sericin/gelatin 3-D scaffolds and 2-D films: fabrication and characterization for potential tissue engineering applications. *Acta Biomaterialia* 2009; 5(8):3007–3020.

24. Schroder U. Effects of calcium hydroxide-containing pulpcapping agents on pulp cell migration, proliferation, and differentiation. *J Dent Res* 1985; 64:541-548.
25. Tran XV, Gorin C, Willig C, Baroukh B, Pellat B, Decup F, et al. Effect of a calcium–silicate-based restorative cement on pulp repair. *Journal of Dental Research* 2012; 91(12):1166-1171.

## Anexos

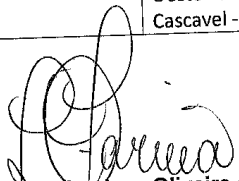
## Anexo 1 – Parecer do Comitê de Ética no Uso de Animais – CEUA



### Certificado Experimental no Uso de Animais em Pesquisa Nº 60/17 - CEUA

Certificamos que a proposta intitulada “**Avaliação histológica da resposta pulpar do capeamento direito com sericina de seda em ratos**”, registrada com o número “41/16”, sob a responsabilidade de “Christian Giampietro Brandão”, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pelo COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ (UNIOESTE), em reunião de 08/12/2017.

Finalidade	Pesquisa Científica
Vigência da autorização	20/10/2016 - 29/11/2016
Espécie/linhagem/raça	Rato heterogênico <i>Rattus norvegicus</i> Wistar
Nº de animais	34
Peso/idade	250g/60 dias
Sexo	Masculino
Origem	Biotério central da Universidade Estadual do Oeste do Paraná - UNIOESTE - campus Cascavel - PR.

  
**Prof. Dra. Luciana Oliveira de Fariña**  
 Coordenadora do CEUA UNIOESTE  
 Portaria nº3730/2016

## Anexo 2 – Instrução aos autores do periódico (REVISTA)



ISSN 0103-6440 *print*  
*version*  
 ISSN 1806-4760 *online*  
*version*

## INSTRUCTIONS TO AUTHORS

- [Scope and policy](#)
- [Form and preparation of manuscripts](#)
- [Submission of manuscript](#)

### Scope and policy

The Brazilian Dental Journal is a peer-reviewed (double-blind system) scientific journal that publishes Original Full-Length Papers, Short Communications, Case Reports and Invited Reviews, dealing with the several fields of dentistry or related areas, with open access. Only original papers will be considered for publication. In submitting a manuscript, the authors should state in the cover letter that the material has not been published previously and is not under consideration by another journal in either electronic or printed versions.

#### ELECTRONIC ADDRESS FOR SUBMISSION

<http://mc04.manuscriptcentral.com/bdj-scielo>

MANUSCRIPTS MUST BE SUBMITTED IN ENGLISH. Authors whose primary language is not English must have their manuscript reviewed by someone proficient in English. **Manuscripts accepted for publication will be submitted to the Technical Review for revision of English grammar and scientific writing and to fit the text into the Journal's standards. The cost of the Technical Review will be charged to the authors. Submission of a manuscript to BDJ implies the acceptance of these terms.** The decision of acceptance for publication relies on the Editors and is based on the recommendation of the Editorial Board and/or *ad hoc* reviewers. Authors of manuscripts not recommended for publication will receive an email explaining the decision. The concepts emitted in the papers published in the BDJ are the sole responsibility of the authors, not necessarily reflecting the Editorial Board's opinion.

All manuscripts will be submitted to peer-review. Authors and referees will be kept anonymous during the review process. Articles accepted for publication become property of the journal.

Brazilian Dental Journal is an open access journal, which means that all published articles are freely available on the Internet immediately upon publication.

The Brazilian Dental Journal shall retain the copyright and publishing rights of all published articles, including translations. Users can use, reuse and build upon the material published in the journal but only for non-commercial purposes and provided the source is clearly and properly mentioned.

The Journal adopts plagiarism identification system (AntiPlagiarist - ACNP Software)

The Brazilian Dental Journal is indexed by DOAJ database for public access.

## Form and preparation of manuscripts

### THE FOLLOWING GUIDELINES MUST BE FOLLOWED CAREFULLY.

#### General

- • The authors must submit the manuscript in Word and in PDF, comprising the title page, text, tables, figure captions and figures (photographs, micrographs, radiographs, schematic drawings, graphs, computer-generated images, etc).
- • The manuscript must be typed in Times New Roman 12 font, with 1.5 spacing, 2.5-cm margins at each side. **DO NOT USE** bold letters, watermarks or other resources to make the text visually attractive.
- Pages should be numbered consecutively, starting with the summary.
- Full-length manuscripts are assembled in the following sections:
  - 1) Title Page
  - 2) Summary and Key Words
  - 3) Introduction; Material and Methods; Results; Discussion
  - 4) Summary in Portuguese (an item necessary for Latin American Indexing Services that will be provided for non-Brazilian authors by the Journal)
  - 5) Acknowledgements (if any)
  - 6) References
  - 7) Tables
  - 8) Figure captions
  - 9) Figures
- All titles of sections (Introduction, Material and Methods, etc) must be capitalized in regular font type (not bold).

- Results and Discussion **MUST NOT** be joined in a single section.
- Short Communications and Case Reports should be divided into appropriate sections.
- Products, equipments and materials: the trade name must be followed by the manufacturer's name, city, state and country, within parentheses upon first mention. For further mentions, only the manufacturer's name is required.
- All abbreviations must be explained at first mention.

### **Title page**

- The first page must contain the title of the manuscript, a short title (maximum of 40 characters, to be used as a running head), author(s) name(s) (no more than 6) and their Department(s), School(s) and/or University (s). **DO NOT INCLUDE** the author's titles (DDS, MSc, PhD, etc.) or position (Professor, Graduate student, etc.).
- Provide the name and **complete** address of the corresponding author (inform email, telephone and fax numbers).
- The title page must be uploaded at the website as a separate file (not included in the body of the manuscript).

### **Manuscript**

- The first page of the manuscript must contain: title of the manuscript, short tile with no more than 40 characters, and NO authors' names or identification.

### **Summary**

- The second page should contain a summary of no more than 250 words, stating the aims, methods, results, and any conclusions drawn from the study. Do not use topics and paragraphs and do not cite references in the Summary.
- A list of key words (no more than 5) should be included below the summary in lowercase letters, separated by commas.

### **Introduction**

- Summarize the purpose of the study, giving only pertinent references. Do not review existing literature extensively. State clearly the working hypothesis.

### **Material and Methods**

- Material and methods should be presented in

sufficient detail to allow confirmation of the observations. **Indicate the statistical methods used, if applicable.**

### Results

- Present the results in a logical sequence in the text, tables and figures, emphasizing the important information.
- Do not repeat in the text data contained in the tables and illustrations. The important observations should be emphasized.
- Do not repeat the same data in tables and figures.
- Describe the statistical data in this section.

### Discussion

- Summarize the findings without repeating in detail the data given in the Results section.
- Relate your observations to other relevant studies and point out the implications of the findings and their limitations. Cite pertinent studies.
- Present your conclusions at the end of the Discussion, indicating how your study is pertinent and/or its clinical implications. Presentation of the conclusions in topics should be avoided.

### Summary in Portuguese (for Brazilian authors only)

- The Summary in Portuguese should be **IDENTICAL** to the English version (Summary). **DO NOT INCLUDE** title and key words in Portuguese.

### Acknowledgements

- Financial support by government agencies should be acknowledged. If appropriate, technical assistance or assistance from colleagues may be acknowledged.

### References

- References must follow the Journal's style. Authors should refer to a current issue of the BDJ for guidance on reference citation and presentation of the reference list.
- References must be numbered consecutively in the text in order of citation, within parentheses, without space between numbers: (1), (3,5,8), (10-15). **DO NOT USE** superscript numbers.

- For papers with two authors, cite both authors in the text, as follows: Ex: "According to Santos **and** Silva (1)...". If there are more than 3 authors, cite only the first author and add "et al.". Ex: "Pécora et al. (2) reported that..."
- All authors of each paper should be included in the Reference List unless there are 7 or more. In this case, the first 6 authors should be given, followed by "et al."
- The reference list must be typed at the end of the manuscript in numerical sequence. **No more than 25 references may be cited.**
- Citation of abstracts and books, as well as articles published in non-indexed journals should be avoided, unless absolutely necessary. **Do not cite references in Portuguese.**
- Abbreviations of journal titles should conform to those used in Dental Index. The style and punctuation of references must follow the format illustrated below:

#### *Journal articles*

1. Lea SC, Landini G, Walmsley AD. A novel method for the evaluation of powered toothbrush oscillation characteristics. *Am J Dent* 2004;17:307-309.

#### *Book*

2. Shafer WG, Hine MK, Levy BM. *A Textbook of Oral Pathology*. 4th ed. Philadelphia: WB Saunders; 1983.

#### *Chapter in a Book*

3. Walton RE, Rotstein I. Bleaching discolored teeth: internal and external. In: *Principles and Practice of Endodontics*. Walton RE (Editor). 2nd ed. Philadelphia: WB Saunders; 1996. p 385-400.

#### **Tables**

- Each table with its title must be typed after the text. Tables should be numbered with Arabic numerals. **DO NOT USE** vertical lines, bold letters and capital letters (except the initials).
- The corresponding title should appear at the top of each table.
- Tables must contain all necessary information and be understandable without allusions to the text.

#### **Figures**

- **BDJ WILL NOT ACCEPT FIGURES EMBEDDED IN FILES ORIGINATED IN TEXT-EDITING SOFTWARE (WORD OR SIMILAR) OR FIGURES ORIGINATED IN POWER POINT.**
- The digital files of the images should be generated in Photoshop, Corel or any other



image-editing software and saved in the CD-ROM. Image files should have TIFF extension and 300 dpi minimum resolution. Only BLACK & WHITE figures are accepted. Save the figures in the CD-ROM.

- Lettering and identifying marks must be clear and sharp, and the critical areas of x-rays and photomicrographs must be demarcated and/or isolated.
- Separate parts of composite figures must be labeled with capital letters (A, B, C, etc). Single figures and composite figures must have minimum width of 8 cm and 16 cm, respectively.
- Figure captions should be numbered with Arabic numerals and typed on a separate page, after the lists of references or after the tables (if any)

## **Submission of manuscripts**

### **CHECKLIST FOR AUTHORS PRIOR TO SUBMISSION**

1. Submission letter;
2. Title page.
3. Manuscript file (text, tables, figure captions).
4. In the manuscript, observe:
  - identification of authors only on the title page.
  - text typed in Times New Roman 12 font, with 1.5 spacing, 2.5-cm margins at each side.
  - tables, figure captions and figures at the end of the manuscript.
5. Digital files of figures, black & white, saved in TIFF format with minimum resolution of 300 dpi.

There are no fees for submission and evaluation of articles.

The Technical Review Fee ranges from R\$450,00 to R\$ 550,00 Reais Brasileiros (for Brazilian authors) or U\$200 to 300 American dollars (for foreign authors) and will be charged to the corresponding author, even if only minor corrections to the manuscript are needed.