

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

ADRIANO FONSECA DE LIMA

***AVALIAÇÃO DA BIOCOMPATIBILIDADE DO CLAREAMENTO DENTAL CASEIRO
E DE TERAPIAS PARA A REDUÇÃO DOS EFEITOS DELETÉRIOS DOS AGENTES
CLAREADORES SOBRE O TECIDO PULPAR: ESTUDOS “IN VITRO” E “IN VIVO”***

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do Título de Doutor em Clínica Odontológica – Área de Concentração em Dentística

Orientadora: Prof. Dra. Giselle Maria Marchi Baron

Co-Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto de Souza Costa

Este exemplar corresponde à versão final da Tese defendida pelo aluno, e orientada pela Profa. Dra. Giselle Maria Marchi Baron.

Assinatura do Orientador

PIRACICABA

2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
MARILENE GIRELLO – CRB8/6159 - BIBLIOTECA DA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA DA UNICAMP

L628a Lima, Adriano Fonseca de, 1981-
Avaliação da biocompatibilidade do clareamento dental caseiro e de terapias para a redução dos efeitos deletérios dos agentes clareadores sobre o tecido pulpar: estudos “in vitro” e “in vivo” / Adriano Fonseca de Lima. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 2012.

Orientador: Giselle Maria Marchi Baron.
Coorientador: Carlos Alberto de Souza Costa.
Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Odontoblastos. 2. Lasers. 3. Vitamina C. I. Baron, Giselle Maria Marchi, 1970- II. Costa, Carlos Alberto de Souza. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. IV. Título.

Informações para a Biblioteca Digital

Título em Inglês: Evaluation of the Biocompatibility of the at-home dental bleaching and therapies for reduction of the deleterious effects caused by the bleaching agents on the pulp tissue: in vitro and in vivo studies

Palavras-chave em Inglês:

Odontoblasts

Lasers

Vitamin C

Área de concentração: Dentística

Titulação: Doutor em Clínica Odontológica

Banca examinadora:

Giselle Maria Marchi Baron [Orientador]

Marcelo Tavares de Oliveira

José Augusto Rodrigues

Mário Alexandre Coelho Sinhoreti

Mônica Campos Serra

Data da defesa: 07-03-2012

Programa de Pós-Graduação: Clínica Odontológica



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Odontologia de Piracicaba



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de Doutorado, em sessão pública realizada em 07 de Março de 2012, considerou o candidato ADRIANO FONSECA DE LIMA aprovado.

Profa. Dra. GISELLE MARIA MARCHI BARON

Profa. Dra. MÔNICA CAMPOS SERRA

Prof. Dr. MARCELO TAVARES DE OLIVEIRA

Prof. Dr. JOSÉ AUGUSTO RODRIGUES

Prof. Dr. MARIO ALEXANDRE COELHO SINHORETI

DEDICATÓRIA

À minha **mãe Célia**, que me ensinou todos os valores que carrego até hoje em minha vida, em todos os momentos. Com você aprendi que devemos correr atrás do que desejamos, e que todo trabalho deve ser realizado de forma correta, séria e com dedicação.

Ao **meu pai Rolando (in memorian)**, que mesmo não estando presente em grande parte da minha caminhada, está sempre comigo, e tenho certeza que torcendo por minha felicidade. Devo muito a você diante tudo que conquistei até aqui, e tudo que irei conquistar.

À **minha irmã Alexandra**, mulher de coragem e fibra, extrema competência e inteligência, que sempre me ajudou e não hesita em nenhum instante quando preciso. Muito obrigado pela amizade e companheirismo.

À **minha noiva Jéssica**, que me entende, ajuda, apoia e dá forças, para que eu continue meu trabalho, mesmo nas situações mais difíceis. Obrigado por ser essa pessoa tão carinhosa e compreensiva. Tenha certeza que você foi indispensável por todo meu trabalho, e peço que continue ao meu lado em minha caminhada.

Te amo muito.

A vocês, MUITO OBRIGADO por tudo, e tenham certeza de que foram indispensáveis e também, responsáveis por todo meu trabalho e pelo que sou.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À minha orientadora, **Profa. Dra. Giselle Maria Marchi**, que desde a iniciação científica, passando pelo mestrado e finalizando agora com a conclusão de meu doutorado, demonstrou extrema atenção, carinho e dedicação, e me ensinou a trabalhar de maneira correta, eficiente, no entanto, nunca diminuindo e esquecendo o valor da família e dos amigos.

Ao meu co-orientador, **Prof. Dr. Carlos Alberto de Souza Costa**, por me aceitar como orientado tanto no mestrado como no doutorado, e acreditar em mim durante todo o curso. Características como eficiência, dedicação e amor pelo que faz, presentes em seu caráter e modo de agir, me ensinaram como trabalhar com qualidade, de modo honesto e seguro, me auxiliando a obter êxito frente à todas adversidades presentes na pós-graduação.

Agradeço aos dois por tudo que conquistei, e a todos objetivos que, com dedicação, conseguirei alcançar durante minha carreira. Tenham certeza de que a união das diferentes características presentes em cada um de vocês foi imprescindível para a minha formação, tanto profissional como pessoal. MUITO OBRIGADO!

AGRADECIMENTOS

Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas, nas pessoas do **diretor Prof. Dr. Jacks Jorge Júnior e do diretor associado Prof. Dr. Alexandre Augusto Zaia.**

À **Profa. Dra. Renata Cunha Matheus Rodrigues Garcia**, coordenadora geral dos cursos de Pós-Graduação e ao **Prof. Dr. Márcio de Moraes**, coordenador do curso de Pós-Graduação em Clínica Odontológica.

A **Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)**, pelo apoio financeiro que me foi dado durante a iniciação científica, mestrado e doutorado, em forma não só de bolsa de estudo, mas também auxiliando o custeio de todo projeto;

À Faculdade de Odontologia de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita”, na pessoa do **diretor Prof. Dr. José Claudio Martins Segalla.**

À **Prof. Dra. Josimeri Hebling**, pessoa pela qual tenho respeito absoluto. Sua dedicação e competência enormes, conseguem ser inferiores à sua bondade e gentileza, perceptíveis à todas as pessoas que lhe conhecem. Muito Obrigado pelos ensinamentos, que foram muitos, fazendo com que eu possa lhe considerar mais uma orientadora em minha formação.

Aos Profs. da Área de Dentística, **Prof. Dra. Giselle Maria Marchi, Prof. Dr. Flávio H. Baggio Aguiar, Prof. Dr. Luis Alexandre M. S. Paullilo, Prof. Dr. Luís Roberto M. Martins, Prof. Dr. José Roberto Lovadino, Prof. Dr. Marcelo Giannini e Profa. Dra. Débora Alves N. L. Lima**, pelos conhecimentos transmitidos.

Aos **Profs. Marcelo Tavares de Oliveira, José Augusto Rodrigues, Mônica Campos Serra, Mário Alexandre Coelho Sinhoreti, André Figueiredo Reis, Willian Cunha Brandt e Flávio Henrique Baggio Aguiar**, membros titulares e suplentes da banca de

doutorado, que aceitaram e se dispuseram a avaliar meu trabalho, e que com certeza, contribuíram em muito para o enriquecimento dos estudos apresentados.

Aos **Profs. Luís Roberto Marcondes Martins, Flávio Henrique Baggio Aguiar e Débora Alves N. L. Lima**, membros da banca do exame de qualificação, pela cuidadosa leitura e importantes observações que contribuíram para a melhora do presente trabalho.

Aos meus amigos de doutorado, **Maria Humel, Giulliana Soares, Marina Di Francescantonio, Thaiane Aguiar, Cinthia Araújo, Gisele da Silva e Bruno Barreto**, pela convivência e amizade durante todo o curso.

Aos meus amigos de orientação, **Lívia Aguilera, Larissa Araújo, Kamila G. Menezes e Alan Palialol**, pelos momentos de trabalho e lazer, e por me aguentarem durante o curso.

A todos meus colegas de pós graduação. Obrigado pelos momentos engraçados, felizes e de descontração. Vocês também foram muito importantes em toda minha formação.

Ao **Prof. e amigo Marcelo Rocha Marques**, que sempre me ajudou tanto em procedimentos laboratoriais, como nas longas, sérias e também divertidas conversas a respeito dos mais diferentes tópicos. Grande Abraço.

Aos amigos **Maria, Jessica Mie, Hugo do Valle, Bia D'Arce e Ciça Giorgi**, pelos conselhos, apoio e momentos alegres e engraçados que passamos.

Aos funcionários da Dentística, **Mônica e Pedrão**, por nos auxiliarem durante todo o curso, e manterem o laboratório o mais em ordem possível.

À **Prof. Dra. Andrea Nóbrega Cavalcanti (Dea), Prof. Dr. Fábio Mitsui (Fabinho) e Prof. Dra. Alessandra Peris (Alê)**, por me co-orientarem na iniciação, e me ensinarem a base de toda pesquisa, assim como disciplina, além de nossa amizade. Muito Obrigado!

À **Fernanda G. Basso e Ana Paula Dias Ribeiro**, alunas do Lab. de Patologia e Biomateriais da UNESP Araraquara, que foram indispensáveis para que os trabalhos aqui apresentados fossem realizados. Muito Obrigado pela amizade, força e paciência que

tiveram comigo. Nunca esquecerei o apoio que me deram, e as pessoas maravilhosas que vocês são.

Às amigas que fiz no departamento de Patologia e Fisiologia de Araraquara, como **Lu Bianchi, Nancy, Aninha, Flávia, Fer Basso, Diana, Jú, Fer Vargas, Ana (Pops), Hérica, entre outras**, que me auxiliaram em muito nos trabalhos, e pelo convívio agradável.

Ao **Lucas, Mauro e Alan**, pessoas que conviveram comigo no doutorado, e que me ajudaram nos momentos difíceis, assim como nos momentos em que saímos pra beber e comemorar.

Aos meus “sogros” **Gisele e Antonio Sérgio**, e minhas “cunhadas” **Tânia e Gabi**, por me proporcionarem uma segunda família, me recebendo de braços abertos.

Ao **Bolão, Rafa, Julião, Mateus, Lester, Paraíba**, que conviveram comigo na Delta 9, e fizeram que minha graduação fosse mais fácil, bem mais fácil!! Grande Abraço.

Aos meus **grandes amigos de Mogi Guaçu, da “Casinha”**, pelo apoio, diversão e companhia durante os jogos do TIMÃO!!!

A todos que contribuíram para minha formação, amigos que me ajudam e conhecem meu respeito e admiração, sejam estes aqui da FOP ou de outros lugares

MEUS SINCEROS AGRADECIMENTOS!!!

EPÍGRAFE

“Não são as respostas que movem o mundo, mas sim as perguntas.”

Autor desconhecido, vinheta TV Futura

RESUMO

Os objetivos do presente trabalho foram: a) avaliar os efeitos citotóxicos de aplicações sucessivas do agente clareador à base de peróxido de carbamida (PC) 10% sobre células odontoblásticas; b) avaliar a toxicidade “in vivo” do tratamento clareador em dentes de ratos Wistar; c) verificar se o ácido ascórbico (AA) é capaz de reduzir os efeitos tóxicos do tratamento clareador na polpa de ratos Wistar; d) verificar a eficácia da laserterapia em diferentes parâmetros de aplicação na modulação da resposta de células odontoblastóides frente à agressão causada pelos agentes clareadores. Para isso, no Capítulo 1, foi avaliado a toxicidade de aplicações sucessivas de agentes clareadores à base de PC10% e do peróxido de hidrogênio (PH) 35% sobre células odontoblastóides MDPC-23. As células foram expostas aos subprodutos clareadores por 1h durante 1 ou 5 dias, e então foi avaliado o metabolismo celular, atividade da fosfatase alcalina (ALP) e os danos à membrana celular. Pôde-se observar que uma aplicação de PC10% não causou danos às células odontoblastóides, no entanto, as aplicações sucessivas causaram severa toxicidade à estas células. Tanto PC10% como PH35% causaram redução na atividade da ALP. No Capítulo 2, o objetivo foi avaliar se o AA seria capaz de reduzir a inflamação causada pelos agentes clareadores na polpa de ratos Wistar. Grupos foram estabelecidos com e sem administração de AA, e as soluções aplicadas 1h e 30min antes da realização do procedimento clareador. Foi observado necrose do tecido pulpar dos ratos após 6h e 24h o clareamento. O AA não foi capaz de impedir a necrose do tecido, no entanto, melhor capacidade de reparação foi verificada na polpa dental destes animais. No capítulo 3 e 4, foram analisados se 1 ou 3 sessões de laserterapia poderiam modular a resposta celular após exposição aos agentes clareadores. As células foram expostas ao agente clareador, e após isso, foram realizadas as sessões de laserterapia (InGaAsP - 780nm - doses de 4, 10 e 15J/cm²) com intervalo de 24 h entre cada uma delas. O clareamento

causou redução do metabolismo celular e da atividade da FA; a laserterapia não foi capaz de modular positivamente o metabolismo celular. No entanto, a dose de 4 J/cm² aumentou a atividade da FA nas células com e sem exposição ao agente clareador. A laserterapia não foi capaz de modular o metabolismo celular, nem a atividade de FA, expressão gênica de FA e colágeno-I (COL-I). No entanto, a laserterapia causou redução da expressão gênica de fibronectina (FN), nas células sem exposição ao agente clareador. Diante dos resultados obtidos, pode-se concluir que aplicações consecutivas de PC10% podem causar extensos danos às células MDPC-23; o PH 35% causou necrose da câmara pulpar de ratos Wistar, e que o AA não foi capaz de impedir os danos causados pelo tratamento clareador; uma aplicação do laser nas doses de energia avaliadas não foi capaz de modular a resposta celular após o clareamento. Apenas três aplicações de laser na dose de 4 J/cm² foram capazes de aumentar a atividade da FA produzida pelas células odontoblastóides.

Palavras-chave: odontoblastos, lasers, vitamina C

ABSTRACT

The objectives of the present study were: a) to evaluate the cytotoxic effects of consecutive applications of a bleaching agent based on 10% cabamide peroxide (CP) on odontoblastic cells; b) to evaluate the “in vivo” toxicity of the bleaching treatment on the pulp tissue of Wistar rats; c) to evaluate if the ascorbic acid (AA) is capable to reduce the toxic effects of the bleaching treatment to the dental pulp of the Wistar rats; d) to analyze the efficacy of the lasertherapy with different patterns on the odontoblastic cell response, in face of the deleterious effects caused by the bleaching agents. At the Chapter 1, the toxicity of consecutive applications of a 10%CP gel and 35% hydrogen peroxide (HP) on odontoblast-like cells was evaluated. The cells were exposed to the bleaching products for 1h during 1 or 5 days, and the cell metabolism, alkaline phosphatase (ALP) activity and cell membrane damage were evaluated. It could be observed that 1 application of 10%CP did not cause deleterious effect to the odontoblastic cells, however, consecutive applications caused severe toxicity to these cells. Both 10%CP and 35%HP promoted reduction on the ALP activity. At the Chapter 2, the aim was to evaluate if AA would be able to reduce the inflammation caused by the bleaching agents on the dental pulp of Wistar rats. Groups were formed with and without AA administration, and the solutions were applied 1h and 30min before the bleaching procedure. Pulp necrosis was observed 6h and 24h after bleaching. The AA was not capable to prevent the tissue necrosis, however, faster tissue repair was observed in the dental pulp of the animals treated with AA. At the Chapters 3 and 4, were evaluated if 3 or 1 lasertherapy sessions would modulate the cell response after exposition to bleaching agents. The cells were exposed to the bleaching agent, and the lasertherapy was performed after this (InGaAsP – 780nm- doses 4, 10 e 15 J/cm²), with interval of 24h between each session. The bleaching reduced the cell metabolism and ALP activity, and the lasertherapy was not able to influence positively the cell metabolism.

Nevertheless, the energy dose of 4 J/cm^2 increase the ALP activity on cell with or without exposition to bleaching agente when 3 session of laser were performed. The lasertherapy was not capable to modulate the cell metabolism, ALP activity and gene expression of ALP and collagen-I (COL-I). Nevertheless, one session of laser irradiation decreased the gene expression of fibronectin (FN), on the cells without exposition to bleaching agent. It can be concluded that consecutive applications of 10%CP can cause extensive damage to the MDPC-23 cells; HP35% caused pulp necrosis at the teeth of the Wistar rats, and AA was not capable to prevent the damages caused by the bleaching treatment; one application of the laser, in the energy doses evaluated, was not capable to modulate the cell response after bleaching. Three applications of laser with the energy dose of 4 J/cm^2 increased the ALP activity produced by the odontoblast-like cells.

Keywords: odontoblasts, lasers, vitamin C

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	1
CAPÍTULO 1 – <i>“Toxic effects of daily applications of 10% carbamide peroxide on odontoblast-like MDPC-23 cells”</i>	5
CAPÍTULO 2 – <i>“Resposta pulpar a procedimentos clareadores realizados em dentes de ratos tratados com ácido ascórbico”</i>	25
CAPÍTULO 3 – <i>“Efeito da terapia com laser em baixa potência na modulação da resposta de células odontoblastóides expostas a agentes clareadores”</i>	51
CAPÍTULO 4 – <i>“Efeito da irradiação laser sobre a viabilidade e expressão de proteínas dentinárias por odontoblastos expostos a agentes clareadores”</i>	73
CONSIDERAÇÕES GERAIS	101
CONCLUSÃO	105
REFERÊNCIAS	107
ANEXOS	111

INTRODUÇÃO

O clareamento dental tem sido amplamente empregado como procedimento odontológico estético, devido à sua fácil realização e por ser considerado um tratamento seguro e não invasivo. No entanto, os termos “seguro” e “não invasivo” para os agentes clareadores se encontra sob questionamentos (Nour El-din *et al.*, 2006), devido aos diversos efeitos colaterais observados após esse procedimento, como alteração da microdureza do esmalte (Rodrigues *et al.*, 2005; Zantner *et al.*, 2007), redução da resistência de união à superfície recém-clareada (da Silva *et al.*, 2010; Lima *et al.*, 2010a), efeitos tóxicos para as células pulpares (de Lima *et al.*, 2009; Dias Ribeiro *et al.*, 2009; Lima *et al.*, 2010c; Soares *et al.*, 2011), inflamação leve podendo acarretar em casos extremos, necrose da polpa coronária (Robertson *et al.*, 1980; Costa *et al.*, 2010; Kina *et al.*, 2010).

Os efeitos colaterais negativos observados para a técnica de clareamento de consultório foram avaliados por estudos prévios “*in vitro*” (Coldebella *et al.*, 2009; Dias Ribeiro *et al.*, 2009; Trindade *et al.*, 2009), os quais demonstraram que quando estes agentes foram aplicados sobre discos de esmalte/dentina ocorreu expressiva redução no metabolismo celular, bem como alterações importantes na morfologia de células odontoblastóides em cultura (Coldebella *et al.*, 2009; Dias Ribeiro *et al.*, 2009; Trindade *et al.*, 2009). Os dados obtidos destes estudos *in vitro* foram complementados pelo estudo *in vivo* de Costa *et al.* (2010), no qual foi observado necrose da região superior da polpa coronária de incisivos inferiores humanos clareados com gel contendo 35% de peróxido de hidrogênio (H₂O₂).

Enquanto os efeitos tóxicos dos agentes clareadores de consultório estão demonstrados na literatura, os efeitos dos agentes de baixa concentração para utilização caseira (H₂O₂ ou peróxido de carbamida (PC) com concentrações de 6-16%) sobre as

células pulpaes ainda não foram completamente elucidados. Estudos prévios demonstraram que os agentes à base de peróxido de carbamida 16% causaram danos às células odontoblastóides com consequente redução na viabilidade celular (Lima *et al.*, 2010c; Soares *et al.*, 2011), tanto quando aplicados sobre discos de dentina (Lima *et al.*, 2010c) ou mesmo sobre discos contendo esmalte e dentina (Soares *et al.*, 2011). Esses mesmos estudos observaram que quando o clareamento é realizado com peróxido de carbamida a 10%, os danos às células não foram significativos, sugerindo que o tratamento clareador com esses agentes provavelmente não promove danos pulpaes relevantes. No entanto, nesses estudos foi avaliado o efeito de uma única aplicação do gel clareador com 10% de peróxido de carbamida sobre as células em cultura. Em geral, os agentes clareadores caseiros são aplicados por um período mínimo de duas semanas para obtenção de resultados estéticos satisfatórios.

A ação dos materiais clareadores na polpa dental está relacionada com a concentração de PH no gel aplicado sobre o substrato bem como espessura de esmalte/dentina do elemento dental (Hanks *et al.*, 1993; de Lima *et al.*, 2009; Costa *et al.*, 2010). Dentes posteriores, como pré-molares, apresentam baixa ou nenhuma resposta inflamatória pulpar frente ao tratamento clareador, mesmo quando este procedimento é realizado com géis com alta concentração de PH na sua composição (Costa *et al.*, 2010; Kina *et al.*, 2010). No entanto, dentes anteriores, tais como incisivos, os quais são os principais alvos do tratamento clareador, apresentam delgada espessura de esmalte e dentina, o que favorece a exposição do tecido pulpar aos componentes tóxicos liberados pelos agentes clareadores (Costa *et al.*, 2010).

Tem sido demonstrado que agentes antioxidantes podem reduzir o dano celular frente à ação dos agentes clareadores, por inativação das espécies reativas de oxigênio liberadas por este produto (Lima *et al.*, 2010 a,b). Porém, estes resultados foram obtidos em análises *in vitro*, o que limita a aplicabilidade destes dados às diversas situações clínicas, nas quais os agentes clareadores estão envolvidos.

O ácido ascórbico (ascorbato na forma ionizada) é uma vitamina hidrossolúvel com potencial antioxidante (Frei *et al.*, 1988). Alguns estudos demonstraram que o aumento dos níveis plasmáticos desta substância reduz o estresse oxidativo envolvido nos quadros de periodontites (Tomofuji *et al.*, 2009) e aquele induzido por arsênico (Nandi *et al.*, 2005) e chumbo (Patra *et al.*, 2001), sendo que este agente antioxidante pode, também, atenuar o grau de aterosclerose (Ekuni *et al.*, 2009).

Desde que o ácido ascórbico (AA) apresenta um importante papel na redução de danos causados pelo estresse oxidativo às células, a avaliação dos efeitos deste agente antioxidante previamente ao tratamento clareador faz-se importante, visto que danos pulpares devem ser prevenidos durante a realização dos diferentes procedimentos clínicos estéticos.

Outras alternativas podem ser avaliadas buscando uma melhor resposta celular frente a agressão causada pelos agentes clareadores. A terapia utilizando laser de baixa potência tem demonstrado importantes efeitos sobre células, como estimulação da síntese e deposição de matriz de colágeno por fibroblastos (Romanos *et al.*, 1995), aumento da atividade mitocondrial (Karu *et al.*, 1996), da síntese de ATP (Karu, *et al.*, 1995), bem como da proliferação de osteoblastos (Khadra *et al.*, 2005). Foi demonstrado também, a indução de dentinogênese reacional quando foi aplicada a LLLT em cavidades Classe V preparadas em pré-molares humanos (Ferreira *et al.*, 2006).

A obtenção de dados científicos que caracterizem a resposta celular frente aos diferentes tipos de técnicas de clareamento dental, como também o comportamento celular após exposição a diferentes parâmetros de utilização do laser em baixa potência, aliado à terapias que busquem prevenir os danos causados pelo clareamento dental poderá auxiliar no desenvolvimento de um protocolo seguro e eficiente capaz de prevenir, ou pelo menos reduzir os efeitos deletérios para as células pulpares causados pelo procedimento clínico de clarear dentes vitais. Diante disso, a presente tese avaliou o efeito de sucessivas aplicações do peróxido de carbamida 10% no metabolismo de células

odontoblásticas; analisou o efeito dos ácido ascórbico (agente antioxidante) na redução dos danos causados à polpa dental de ratos Wistar; assim como a resposta de células odontoblásticas a diferentes parâmetros de laserterapia.

CAPÍTULO 1

Toxic effects of daily applications of 10% carbamide peroxide on odontoblast-like MDPC-23 cells

Abstract

The aim of this study was to evaluate the toxic effects of successive applications of 10% carbamide peroxide (CP) gel on odontoblast-like MDPC-23 cells. Enamel-dentin discs were adapted in artificial pulp chambers and individually placed in sterile 24-well acrylic plates. The 10% CP was applied to enamel (8h) to obtain the extracts (culture medium + components of bleaching agents diffused through the tooth). The extracts were applied to the cells (1 h) once or five times, with 24 h of interval between each application. Teeth without treatment were used as negative control, and the treatment with high concentration agent (35% hydrogen peroxide - 3 applications of 15 min each) completes the experimental groups. After the treatment, the cell metabolism (MTT), alkaline phosphatase (ALP) activity, and plasma membrane damage (flow cytometry) were analyzed. Reductions in cell metabolism (75%) and alkaline phosphatase activity along with severe damage of the cytoplasmic membrane were noted after the application of 10% CP during 5 days. After 1 application of 10% CP, cell alterations were not observed when compared with the negative control group. Intermediary values of toxicity were

obtained after treatment with 35% HP (positive control); however, ALP activity was not influenced (Mann-Whitney; $p>0.05$). These findings show that 1 application of 10% CP did not cause toxic effects in MDPC-23 cells, but the increased application frequency of this product promoted severe cytotoxic effects, indicating that daily application of bleaching agents with low concentrations of CP can cause extensive damage to pulp cells.

Introduction

Tooth bleaching has been widely used as an esthetic procedure, because it is easy, safe, and non-invasive. Nevertheless, the terms “safe and non-invasive” as they relate to bleaching agents are of concern (1), due to several side-effects of this procedure, such as a reduction in enamel microhardness (2, 3), a decrease in the bond strength of the resin materials to the bleached surface (4, 5), toxic effects in pulp cells (6-10), and inflammation or pulpal necrosis (11, 12).

When applied to enamel/dentin discs, in-office bleaching agents promote a significant reduction of cell metabolism, as well as important morphologic alterations in odontoblast-like cells in culture, as has been demonstrated in previous studies (6, 7, 13, 14). The results obtained in these studies were corroborated by Costa et al. (11), who demonstrated coronary pulp necrosis of human lower incisors after bleaching with 35% hydrogen peroxide (H_2O_2).

The toxicity to pulp cells caused by bleaching agents with high concentrations of CP has been well-documented; however, the effects of low-concentration bleaching agents [H_2O_2 or carbamide peroxide (CP) - 6-16%], as used in the at-home technique, on odontoblast cells have not been fully elucidated. Previous studies showed that 16% CP promotes a significant reduction in cell metabolism and morphologic alterations in odontoblast cells (9, 10), when applied to both dentin (9) and enamel-dentin discs (10). These studies demonstrated that bleaching with 10% CP did not cause significant effects on pulp cells, suggesting that such bleaching probably does not cause relevant alterations in dental pulp. Nevertheless, in these studies, the effect of a single application of 10% CP on cells in culture was evaluated. When used in compliance with manufacturer's instructions, at-home bleaching agents are customarily used for at least 2 wks to obtain satisfactory esthetic results. Therefore, the objective of this study was to analyze the trans-enamel and trans-dentinal effects of successive applications of 10% CP on odontoblast-like MDPC-23 cells, evaluating the cell metabolism, alkaline phosphatase activity, and cell membrane damage.

Materials and Methods

Preparation of discs

One hundred four sound bovine permanent incisors were collected and scaled for the removal of periodontal tissue remnants and other debris. Teeth with enamel

cracks, hypoplasia, calculus in the middle third of the root, or other morphological alterations were excluded. Enamel/dentin blocks were cut transversely from the middle third of the buccal surface of each tooth with a water-cooled, double-faced diamond disc (KG Sorensen, Barueri, SP, Brazil). Next, the specimens were rounded with a high-speed, water-cooled cylindrical diamond bur (1095; KG Sorensen) to obtain specimens having a diameter of 5.2 mm and containing both enamel and dentin. Dentin surfaces were polished with wet 400- and 600-grit silicon carbide paper (T469-SF- Norton; Saint-Gobain Abrasivos Ltda., Jundiaí, SP, Brazil). The final thickness of the enamel/dentin discs was 3.1 mm (1.5 enamel, 1.6 dentin), as measured with a digital caliper (Model 500-144B; Mitutoyo Sul America Ltda., São Paulo, SP, Brazil). A 0.5 mol L⁻¹ ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) solution, pH 7.2, was applied to the dentin surface for 30s to remove the smear layer, and the discs were then rinsed thoroughly with sterile deionized water (15).

Artificial pulp chambers (APC)

Each enamel/dentin disc was adapted individually to artificial pulp chambers with two compartments, which have been previously described (14). The discs were positioned in the upper compartment of the artificial pulp chamber with their enamel side facing upward to receive the bleaching treatments and were secured between two silicone rings (Rodimar Rolamentos Ltda., Araraquara, SP, Brazil) that promoted a tight seal between the upper and lower compartments of the device. In the lower compartment, circular perforations permitted free contact of the culture medium with the

dentin surface of the disc. A 5-mm stainless steel matrix (Injecta Products Odontológicos, Diadema, SP, Brazil) was inserted between the silicone ring and the lateral wall of the upper compartment of the APC. The APCs with the discs in position were autoclaved at 120°C for 15 min and received an additional seal with autoclaved number 7 wax (Wilson Polidental, Cotia, SP, Brazil) in the region between the enamel/dentin disc and the stainless steel matrix in a laminar flow chamber.

Culture of MDPC-23 cells

The odontoblast-like MDPC-23 cell line used in this study was kindly provided by Dr. Carl T. Hanks and Dr. Jacques E. Nör, from the University of Michigan, USA. The cells were cultured in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco, Grand Island, NY, USA), with 100 IU mL penicillin, 100 µg mL streptomycin, and 2 mmol/L glutamine (Gibco) in a humidified incubator with 5% CO₂ and 95% air at 37°C (Isotemp, Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA). The MDPC-23 cells were sub-cultured every 3 days until an adequate number of cells was obtained. The cells were then seeded (12,500 cells/cm²) in sterile 24-well plates (Costar Corp., Cambridge, MA, USA), which were maintained in the humidified incubator with 5% CO₂ and 95% air at 37°C for 72h.

Bleaching procedure

Bleaching gels containing 10% carbamide peroxide (CP-Whiteness Perfect; FGM, Joinville, Brazil) or 35% hydrogen peroxide (HP-Whiteness HP; FGM, Joinville, Brazil)

were evaluated. For the bleaching procedure, the artificial pulp chambers with the enamel/dentin discs in position were placed individually in the wells of sterile 24-well plates, containing 1 mL of DMEM culture medium without FBS. The enamel surface of each disc (facing upward) was washed with 1 mL of sterile deionized water and dried with absorbent paper, and then the bleaching treatment was performed according to group (n=26): G1, control (without treatment); G2, 10% CP (1 application/8h *per* day during 5 days); G3, 10% CP (1 application/8h); and G4, 35% HP (3 consecutive applications of 15 min, totaling 45 min of contact with the enamel). For all groups, after the end of the bleaching treatment, the gel was aspirated, and the enamel surface was thoroughly rinsed with 1 mL of sterile deionized water with concomitant aspiration. For experimental groups 3 and 4, aliquots of 500 µL of the extract obtained from the bleaching agents diffused by the enamel/dentin were collected and applied to the wells after the end of the treatment. For Group 2, after each 8-hour bleaching time in a humidified incubator with 5% CO₂ and 95% air at 37°C, the extracts were collected and applied for 1h to the wells of 24-well plates containing previously cultured MDPC-23 cells, and this procedure was repeated during the 5 days of the bleaching treatment, simulating the daily applications of home bleaching. After each 8-hour bleaching time, a 100-µL quantity of artificial saliva was applied to the enamel surface, which remained in contact with the enamel for 16h in the incubator, corresponding to the time for remineralization of the dentin substrate to occur (16). In the control group (G1), the enamel surface remained in contact with deionized water (8h *per* day) and saliva (16h *per* day) for 5 days.

Analysis of cell metabolism (MTT assay)

In each group, 10 wells were used for analysis of cell metabolism by the cytochemical demonstration of succinic dehydrogenase (SDH) activity, which is a measure of the mitochondrial respiration of the cells by the methyl tetrazolium (MTT) assay, as described previously by Mosmann (1983) (17) and as used in several studies (6, 18, 19). The absorbance values were obtained and statistically analyzed.

Alkaline phosphatase (ALP) activity

Ten wells *per* group were used to evaluate the total protein expression and ALP activity by means of a colorimetric endpoint assay (ALP Kit; Labtest Diagnóstico S.A., Lagoa Santa, MG, Brazil) with a thymolphthalein monophosphate substrate. This is a phosphoric acid ester substrate that is hydrolyzed by ALP and releases thymolphthalein, which gives a bluish color to the solution. The intensity of the resulting color is directly proportional to the enzymatic activity and can be analyzed by spectrophotometry.

The culture medium was aspirated, and the cells were washed with sterile PBS at 37°C. A 1-mL quantity of 0.1% sodium lauryl sulfate (Sigma Chemical Co.) was added to each well and maintained for 30 min at room temperature to produce cell lysis. Next, Falcon tubes (test, standard, and blank) were properly labeled, and a 50-μL quantity of substrate (thymolphthalein monophosphate 22 mmol/L – Kit's reagent #1) and 500 μL of

buffer (300 mmol/L, pH 10.1 – Kit's reagent #2) were added to each tube. A 50- μ L quantity of the standard solution 45 U/L (Kit's reagent #4) was added only to the standard tube. Thirty min after cell lysis, the tubes were placed in a double boiler (Fanem, Guarulhos, SP, Brazil) at 37°C for 2 min. The samples were homogenized, and a 50- μ L quantity from each plate was transferred to the test tubes and maintained in the double boiler under gentle agitation. After 10-minute incubation, 2 mL of color reagent (sodium carbonate 94 mmol/L and sodium hydroxide 250 mmol/L – Kit's reagent #3) were added.

The absorbance of the test was measured at a 590-nm wavelength with a spectrophotometer (Micronal B382, São Paulo, SP, Brazil). ALP activity was calculated by multiplication of the absorbance values by the calibration factor, and the final values were normalized.

Analysis of cell membrane damage

Cell membrane damage was determined with propidium iodide (PI) staining by flow cytometry (n=6). After treatment, a 200- μ L quantity of trypsin was added to each well, and the cells were centrifuged (2000 rpm/2 min). The supernatant was discarded, and a 300- μ L quantity of ligation buffer (10 mM of HEPES, pH 7.4, 150 mM of NaCl, 5 mM of KCl, 1 mM of $MgCl_2$, and 1,8 mM of $CaCl_2$) was added. The cells were treated with 1 μ g/mL of PI, and the intensity of stained cells was determined immediately in a FACS Canto System (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA).

Three independent experiments (MTT, ALP activity, and cell membrane analysis) were undertaken at different times to demonstrate reproducibility.

Statistical Analysis

After exploratory data analysis for evaluation of the homogeneity of variances, and normality of errors, the data obtained from MTT assay and flow cytometry were analyzed by analysis of variance (one-way ANOVA). Multiple comparisons were performed by Tukey's test. The alkaline phosphatase activity was statistically analyzed by Kruskal-Wallis and Mann-Whitney tests. Both multiple-comparison tests were evaluated at a significance level of 5%.

Results

The results obtained for cell metabolism are presented in Fig. 1. One application of 10% CP did not cause a significant reduction in the metabolism of MDPC-23 cells, compared with the negative control group (Tukey, $p > 0.05$). However, in the groups with application of 10% CP on 5 consecutive days, a reduction in cell metabolism was observed (75%), statistically superior to that in the other groups (Tukey, $p < 0.05$). When 35% HP was applied, a reduction in cell viability (45%) was noted, statistically significant

compared with that in the negative control group (G1) and the group with 1 application of 10% CP (G3).

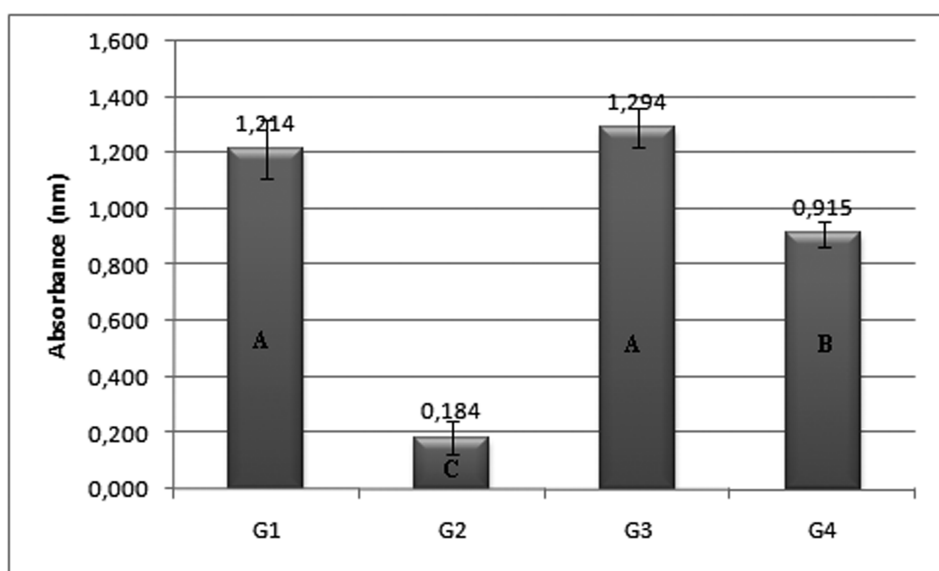


Figure 1 – Graphic representation of the cell metabolism (absorbance - nm) as a function of the different treatments. Different letters indicate statistical differences. (Tukey; $p > 0.05$)

In the evaluation of ALP (Fig 2), the group 2, with 5 consecutive applications of 10% CP demonstrated a significant reduction in the activity of this protein, compared with the other experimental and control groups. The ALP activity was significantly similar among the other groups (G1, G3, and G4).

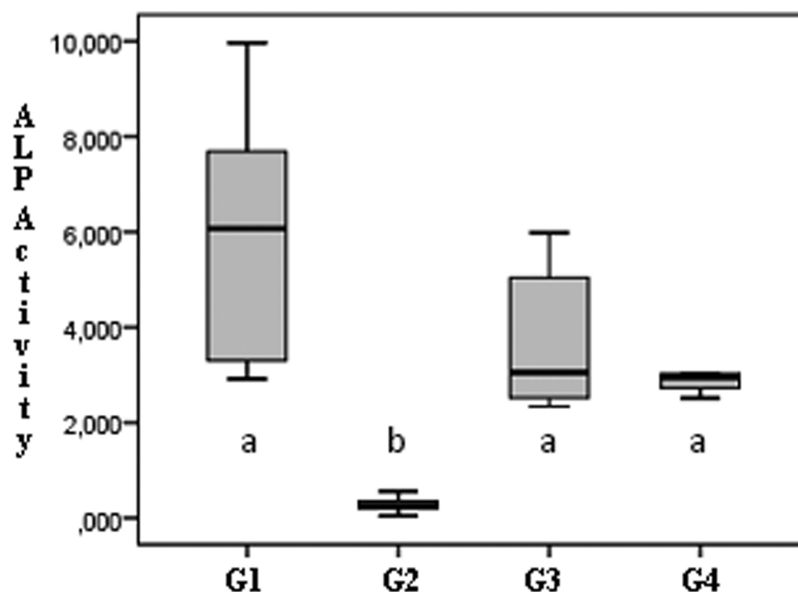


Figure 2 – Graphical representation of the ALP activity (absorbance – nm, U/L) after treatments with the different bleaching agents. Different letters indicate statistical differences (Mann-Whitney; $p < 0.05$).

The results of the membrane cell damage, analyzed by flow cytometry, are presented in Fig. 3. The daily application of 10% CP caused a high intensity of propidium iodide (around 67%), suggesting the disruption of the plasma membrane and cell necrosis. The single application of 10% CP and the positive control (35% HP) caused cellular damage similar to that seen in G2; however, the PI fluorescence intensity was lower than seen with daily application of the at-home agent. All experimental and positive control groups were different from the negative control (without treatment) in this evaluation (Mann-Whitney; $p \leq 0.05$).

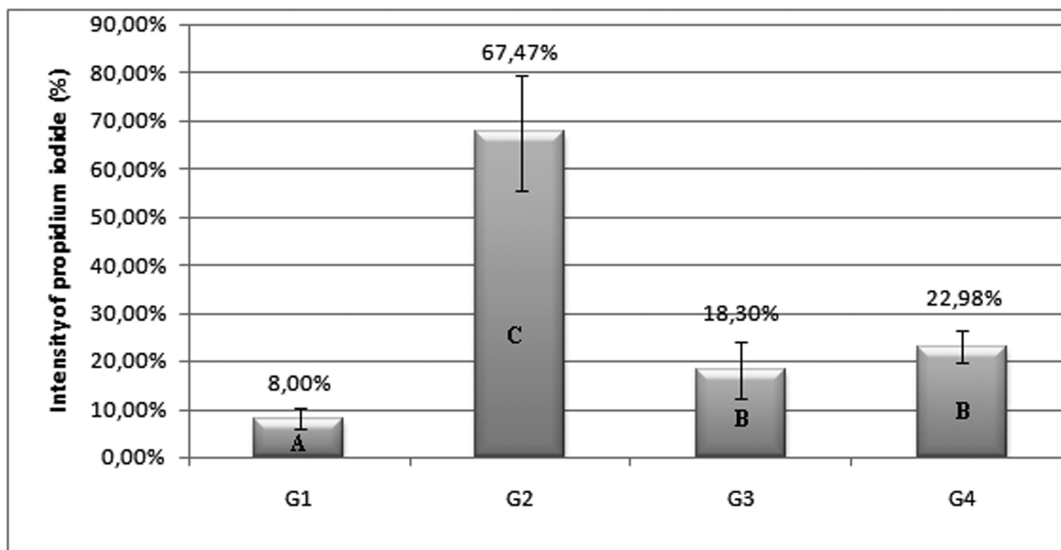


Figure 3 – Intensity of propidium iodide (%) in the analysis of cell membrane damage. Different letters indicate statistical differences (Tukey; $p < 0.05$).

Discussion

The at-home bleaching technique, with low concentrations of carbamide or hydrogen peroxide, seems to be a safer alternative to in-office tooth bleaching, which requires products with high concentrations of those agents, due to their demonstrated high toxicity to dental pulp cells (6, 7, 10).

Recent studies have shown that the bleaching treatment with 10% CP did not cause damage to dental pulp cells (7, 9, 10); however, these studies evaluated the toxicity after only 1 application of the product to the tooth surface. The present study analyzed the toxic effect of daily application of the 10% CP to odontoblast cells.

Odontoblast-like cells were used in this study since these are the first pulp cells to be reached by the products of the materials that diffuse through the tooth structure into the pulp space (6, 8, 14). The MDPC-23 cells present an odontoblast phenotype, expressing pulp proteins such as sialoprotein and dentin phosphoprotein (20, 21), and have been widely used for evaluation of the biocompatibility of dental materials (6, 7, 14).

In the present study, significant reductions in cell viability (75%) and ALP activity were noted after 5 daily exposure to the extracts obtained from the bleaching gel. In addition, numerous cells showed damage to the plasma membrane, suggesting cell death by necrosis.

The toxic effects observed are probably due to the H_2O_2 released from the bleaching agents, which diffuse through the dental hard tissue to the pulpal space, as demonstrated in previous studies (22-24). The products diffused by the enamel and dentin reached the culture medium, forming the extract applied to the cells in the different groups. The H_2O_2 and other molecules released from bleaching agents, such as hydroxyl radicals ($OH^\cdot$), are reactive oxygen species (ROS), which cause oxidative stress when in contact with the cell membrane, characterized by the imbalance between the ROS and antioxidizing agents (25).

The results of the present study showed that a single application of 10% CP (8h) does not cause a significant reduction in the metabolism of MDPC-23 cells. These

results are corroborated by previous studies of the same cell line (9, 10). The absence of toxicity after a single application of 10% CP to enamel-dentin discs can be related to the minimal concentration of H_2O_2 released from the bleaching agent (3.5%), forming an extract with a very low amount of ROS diffused, incapable of causing significant damage to odontoblasts. However, the cumulative effect caused by daily application was capable of promoting an intense reduction in cell viability, even with low concentrations of H_2O_2 in the extract.

One possible explanation for these results is that the reduced time between the bleaching sessions prevented cell healing, showing that the increased application frequency of 10% CP can cause relevant deleterious effects in the pulp cells. In addition, the daily application of 10% CP caused a significant reduction in ALP activity, not observed in the other experimental groups. Part of these results is due to the reduced number of viable cells, resulting in lower ALP activity, protein that is involved in the mineralization of dentin matrix (28). Another observation is that the interaction between the ROS, released from the bleaching agents, and the protein chain can promote a breakdown of the amino acid sequence near the active center of the molecule, causing protein fragmentation (26) and, consequently, reduction of activity.

The reduced cell metabolism and ALP activity were complemented by the results of the flow cytometry, where a higher PI intensity was observed in the group with daily application of 10% CP, compared with the other groups. Propidium iodide is a nucleus marker that exclusively penetrates cells with plasma membrane damage. The

damage is caused by the ROS released from the bleaching agents, which break down the double bonds of unsaturated carbons of the membrane, triggering an autocatalytic reaction known as lipid peroxidation (27). The high PI intensity, indicating cell necrosis after bleaching, combined with the significant reduction in odontoblast viability and ALP activity, demonstrates that the daily application of low-concentration bleaching agents possibly promotes critical pulp damage *in vivo*.

A significant reduction in cell metabolism (45%) was observed after the bleaching protocol with 35% H₂O₂, corroborating the *in vitro* toxicity of this technique, as demonstrated in previous studies (7, 13, 14). The toxicity was possibly caused by the high amount of ROS released from the bleaching agent and diffused through the tooth structure, resulting in the cell damage observed. The toxicity presented by this protocol was statistically high compared with that in the group with 1 application of 10% CP or with the negative control; however, the severity was lower than in the group with 5 applications of the at-home bleaching agent tested. It should be noted that the daily application of 10% CP promoted a cumulative toxic effect, probably preventing cell healing during the sessions, as previously described, and this can be one factor accounting for the high severity observed in this group.

Another possible reason relates to methodology. Due to the different bleaching protocols, the treatment with daily application of 10% CP began 72h after the cells were seeded, with a confluence rate lower than that on the day of application of the 35% H₂O₂. In light of this fact, fewer cells were available on the last day of application of

10% CP (day 5), when the cell metabolism analysis was performed, promoting intense reduction in the cell viability for group 2, statistically superior to that achieved with 35% H₂O₂.

Despite the severe reduction in cell metabolism caused by the products released from the bleaching agents after the daily application of 10% CP, a single application of the same product during 8h did not cause significant damage to the odontoblast cells. These results demonstrate the lower toxicity of the at-home bleaching agent tested compared with the 35% H₂O₂, used for in-office bleaching, when the products are applied for a similar period.

The at-home technique requires daily use of low-concentration bleaching agents, and the results of the present study demonstrate that the consecutive application of these products can promote higher toxicity to the pulp cells, indicating that these low-concentration agents should be used with caution. Some changes in protocol, such as reduced time of contact of the bleaching gel with the tooth surface, as well as an increase in the interval between the sessions, can be an interesting alternative to reduce the toxic effects of the at-home bleaching agents on the pulp cells. Moreover, the presence of intrapulpal pressure, dentinal fluid, immunological and lymphatic systems, production of antioxidizing agents, and other factors can modulate the effects of different treatments on pulp cells, and for this reason results of *in vitro* studies cannot be extrapolated to *in vivo* situations (28). Accordingly, *in vivo* studies should be performed to evaluate the effects of at-home bleaching techniques with carbamide peroxide for long periods.

Conclusion

Based on the results obtained in the present study, it may be concluded that a single application of 10% CP did not result in toxic effects on MDPC-23 cells. Nevertheless, the increased application frequency of those products promoted severe toxic effects on odontoblast-like cells, indicating that the daily application of at-home bleaching agents can cause a significant deleterious effect on pulp cells.

References

1. Nour El-din AK, Miller BH, Griggs JA, Wakefield C. Immediate bonding to bleached enamel. *Oper Dent*. 2006;31: 106-14.
2. Zantner C, Beheim-Schwarzbach N, Neumann K, Kielbassa AM. Surface microhardness of enamel after different home bleaching procedures. *Dent Mater*. 2007;23: 243-50.
3. Rodrigues JA, Marchi GM, Ambrosano GM, Heymann HO, Pimenta LA. Microhardness evaluation of in situ vital bleaching on human dental enamel using a novel study design. *Dent Mater*. 2005;21: 1059-67.
4. da Silva AP, Lima AF, Cavalcanti AN, Marchi GM. Effects of 3% sodium ascorbyl phosphate on the hardness and bond strength of human enamel bleached with 10% carbamide peroxide. *Gen Dent*. 2010;58: e174-8.

5. Lima AF, Fonseca FM, Freitas MS, Palialol AR, Aguiar FH, Marchi GM. Effect of bleaching treatment and reduced application time of an antioxidant on bond strength to bleached enamel and subjacent dentin. *J Adhes Dent*. 2011;13: 537-42.
6. de Lima AF, Lessa FC, Gasparoto Mancini MN, Hebling J, de Souza Costa CA, Marchi GM. Cytotoxic effects of different concentrations of a carbamide peroxide bleaching gel on odontoblast-like cells MDPC-23. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2009;90: 907-12.
7. Dias Ribeiro AP, Sacono NT, Lessa FC, Nogueira I, Coldebella CR, Hebling J, et al. Cytotoxic effect of a 35% hydrogen peroxide bleaching gel on odontoblast-like MDPC-23 cells. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2009;108: 458-64.
8. Lima AF, Lessa FC, Hebling J, de Souza Costa CA, Marchi GM. Protective Effect of Sodium Ascorbate on MDPC-23 Odontoblast-Like Cells Exposed to a Bleaching Agent. *Eur J Dent*. 2010;4: 238-44.
9. Lima AF, Lessa FC, Mancini MN, Hebling J, Costa CA, Marchi GM. Transdental protective role of sodium ascorbate against the cytopathic effects of H₂O₂ released from bleaching agents. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2010;109: e70-6.
10. Soares DG, Ribeiro AP, Sacono NT, Coldebella CR, Hebling J, Costa CA. Transenamel and transdental cytotoxicity of carbamide peroxide bleaching gels on odontoblast-like MDPC-23 cells. *Int Endod J*. 2011;44: 116-25.
11. Costa CA, Riehl H, Kina JF, Sacono NT, Hebling J. Human pulp responses to in-office tooth bleaching. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2010;109: e59-64.

12. Robertson WD, Melfi RC. Pulpal response to vital bleaching procedures. *J Endod*. 1980;6: 645-9.
13. Coldebella CR, Ribeiro AP, Sacono NT, Trindade FZ, Hebling J, Costa CA. Indirect cytotoxicity of a 35% hydrogen peroxide bleaching gel on cultured odontoblast-like cells. *Braz Dent J*. 2009;20: 267-74.
14. Trindade FZ, Ribeiro AP, Sacono NT, Oliveira CF, Lessa FC, Hebling J, et al. Trans-enamel and trans-dentinal cytotoxic effects of a 35% H₂O₂ bleaching gel on cultured odontoblast cell lines after consecutive applications. *Int Endod J*. 2009;42: 516-24.
15. Jacques P, Hebling J. Effect of dentin conditioners on the microtensile bond strength of a conventional and a self-etching primer adhesive system. *Dent Mater*. 2005;21: 103-9.
16. Attin T, Kielbassa AM, Schwanenberg M, Hellwig E. Effect of fluoride treatment on remineralization of bleached enamel. *J Oral Rehabil*. 1997;24: 282-6.
17. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983;65: 55-63.
18. de Mendonca AA, Souza PP, Hebling J, Costa CA. Cytotoxic effects of hard-setting cements applied on the odontoblast cell line MDPC-23. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2007;104: e102-8.
19. de Mendonca AM, de Oliveira CF, Hebling J, Costa CAD. Influence of the activation mode of a self-etch resin-based luting cement upon the metabolism of odontoblast-like cells. *American Journal of Dentistry*. 2011;24: 233-8.

20. Hanks CT, Fang D, Sun Z, Edwards CA, Butler WT. Dentin-specific proteins in MDPC-23 cell line. *Eur J Oral Sci.* 1998;106 Suppl 1: 260-6.
21. Sun ZL, Fang DN, Wu XY, Ritchie HH, Begue-Kirn C, Wataha JC, et al. Expression of dentin sialoprotein (DSP) and other molecular determinants by a new cell line from dental papillae, MDPC-23. *Connect Tissue Res.* 1998;37: 251-61.
22. Gokay O, Mujdeci A, Algn E. Peroxide penetration into the pulp from whitening strips. *J Endod.* 2004;30: 887-9.
23. Gokay O, Tuncbilek M, Ertan R. Penetration of the pulp chamber by carbamide peroxide bleaching agents on teeth restored with a composite resin. *J Oral Rehabil.* 2000;27: 428-31.
24. Gokay O, Yilmaz F, Akin S, Tuncbilek M, Ertan R. Penetration of the pulp chamber by bleaching agents in teeth restored with various restorative materials. *J Endod.* 2000;26: 92-4.
25. Halliwell B. Biochemistry of oxidative stress. *Biochem Soc Trans.* 2007;35: 1147-50.
26. Koyama I, Yakushijin M, Goseki M, Iimura T, Sato T, Sonoda M, et al. Partial breakdown of glycated alkaline phosphatases mediated by reactive oxygen species. *Clin Chim Acta.* 1998;275: 27-41.
27. Halliwell B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol.* 2006;141: 312-22.
28. Costa CA, Hebling J, Hanks CT. Current status of pulp capping with dentin adhesive systems: a review. *Dent Mater.* 2000;16: 188-97.

CAPÍTULO 2

Resposta pulpar a procedimentos clareadores realizados em dentes de ratos tratados com ácido ascórbico

Resumo

Tem sido demonstrado que o clareamento dental acarreta danos às células e tecido pulpar, e que esta toxicidade pode ser reduzida, *in vitro*, pelo uso de um agente antioxidante. No entanto, a efetividade destes agentes *in vivo* ainda não foi avaliada. Diante disso, o objetivo do presente estudo foi avaliar a resposta da polpa dental de ratos ao tratamento clareador, com ou sem administração via oral prévia de um agente antioxidante (ácido ascórbico - AA). Para isto, quarenta ratos machos foram divididos aleatoriamente em 8 grupos (n=5), de acordo com a administração do agente antioxidante (água destilada; AA) e os períodos de avaliação (6h; 24h; 3d; 7d). O tratamento clareador foi realizado com um gel contendo 35% de peróxido de hidrogênio (PH), o qual foi aplicado por 10 min sobre o esmalte da face vestibular dos primeiros molares inferiores. Após o tratamento clareador e decorridos os períodos de avaliação propostos, os animais foram sacrificados, e as mandíbulas processadas para análise microscópica. Nos períodos de 6 e 24hs pós-clareamento, os dentes dos animais submetidos ou não a administração

de AA apresentaram necrose da polpa coronária. No período de 3 dias, foi observado início do processo de reparação do tecido pulpar, sendo que aos 7 dias o reparo tecidual era praticamente completo. De acordo com a metodologia empregada neste estudo in vivo, foi possível concluir que o clareamento dental por 10 min., realizado com gel contendo 35% de PH, causa necrose da polpa coronária, sendo que a resposta tecidual não foi significativamente alterada com a administração prévia de AA.

Introdução

Diversos estudos têm avaliado o clareamento de dentes vitais, não só em relação à sua eficiência [1, 2], mas também os seus possíveis efeitos colaterais, tais como a influência sobre a resistência de união de materiais resinosos à estrutura dental clareada [3, 4], efeitos tóxicos sobre células pulpares [5-9], e possíveis danos à polpa dental [10, 11].

O clareamento dental ocorre devido a ação dos radicais livres oriundos dos agentes clareadores sobre moléculas de pigmentos presentes no esmalte e/ou dentina. A degradação dos pigmentos em cadeias menores resulta em menor absorção de luz, promovendo um aspecto mais claro à estrutura dental [12]. Os radicais livres originados dos géis clareadores, quando em contato com as células pulpares, atacam as duplas ligações dos ácidos graxos insaturados da membrana plasmática, causando uma lesão oxidativa denominada peroxidação lipídica, sendo que esta reação autocatalítica pode causar extensa lesão ou mesmo morte celular [13].

A ação dos materiais clareadores na polpa dental está relacionada com a concentração de peróxido de hidrogênio no gel aplicado sobre o substrato bem como espessura de esmalte/dentina do elemento dental [5, 10, 14]. Dentes posteriores, como pré-molares, apresentam baixa ou nenhuma resposta inflamatória pulpar frente ao tratamento clareador, mesmo quando este procedimento é realizado com géis com elevada concentração de PH na sua composição [10, 11]. No entanto, dentes anteriores, tais como incisivos, os quais são os principais alvos do tratamento clareador, apresentam delgada espessura de esmalte e dentina, o que favorece a exposição do tecido pulpar aos componentes tóxicos liberados pelos agentes clareadores [10].

Tem sido demonstrado que agentes antioxidantes podem reduzir o dano celular frente à ação dos agentes clareadores, por inativação das espécies reativas de oxigênio liberadas por este produto (Lima *et al.*, 2010 a,b). Porém, estes resultados foram obtidos em análises *in vitro*, o que limita a aplicabilidade destes dados às diversas situações clínicas, nas quais os agentes clareadores estão envolvidos.

O ácido ascórbico (ascorbato na forma ionizada) é uma vitamina hidrossolúvel com potencial antioxidante [15]. Alguns estudos demonstraram que o aumento dos níveis plasmáticos desta substância reduz o estresse oxidativo envolvido nos quadros de periodontites [16] e aquele induzido por arsênico [17] e chumbo [18], sendo que este agente antioxidante pode, também, atenuar o grau de aterosclerose [19].

Desde que o ácido ascórbico (AA) apresenta um importante papel na redução de danos causados pelo estresse oxidativo às células, a avaliação dos efeitos deste agente antioxidante previamente ao tratamento clareador faz-se importante, visto que danos pulpares devem ser prevenidos durante a realização dos diferentes procedimentos clínicos estéticos. Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar e comparar a resposta do tecido pulpar de dentes de ratos que receberam administração oral de um agente antioxidante (AA), e cujos dentes foram posteriormente submetidos ou não ao procedimento clareador.

Materias e Métodos

Quarenta ratos machos adultos Wistar (~300 g) foram mantidos em gaiolas plásticas, com acesso à comida e água *ad libitum*. Estes animais foram aleatoriamente divididos em 8 grupos (n=5), de acordo com os tratamentos estabelecidos (Tabela 1). Todos os procedimentos para este estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual de Campinas (protocolo #2515-1).

Tabela 1 – Distribuição dos grupos de acordo com os tratamentos e períodos de avaliação

Grupo	Solução administrada previamente ao clareamento	Tratamento clareador	Períodos de avaliação
1	5 mL de Ácido Ascórbico-AA (200mg/Kg)		6 h
2	5 mL de AA		24 h
3	5 mL de AA		3 d
4	5 mL de AA	2 aplicações de peróxido de hidrogênio 35% (5 min cada). O tratamento foi realizado em todos os grupos	7 d
5	5 mL de água destilada (DW)		6 h
6	5 mL de DW		24 h
7	5 mL de DW		3 d
8	5 mL de DW		7 d

Os dentes contra-laterais do lado direito não foram submetidos ao clareamento, sendo utilizados como controle.

A solução de ácido ascórbico foi preparada a partir da dissolução do pó (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) deste composto em 5 mL de água destilada, de acordo com a dose estabelecida (200mg/Kg). Nos grupos controle, foi administrado, por via oral, somente o veículo da solução (5 mL de água destilada). A administração tanto da

solução experimental de AA quanto da água destilada foi realizada através de gavagem, uma hora e meia antes da realização do tratamento clareador. Este procedimento teve como objetivo fazer com que o procedimento clareador fosse realizado no pico de disponibilidade do agente antioxidante no organismo, tal como previamente demonstrado (Levine et al., 1996; Padayatty et al., 2004).

Para a realização do procedimento clareador, os animais foram anestesiados, por injeção intramuscular, com ketamina (40mg/kg) (Francotar; Virbac do Brasil Industria e Comércio) e xilazina (5mg/mL) (Virbaxil, Virbac do Brasil Industria e Comércio, Roseira, São Paulo, Brazil). Após isso, foi realizado o isolamento relativo da região de molares inferiores, sendo que a face vestibular dos dentes a serem tratados foi limpa com gaze estéril antes do início do procedimento clareador.

O gel clareador à base de peróxido de hidrogênio (HP) 35% (Whiteness HP Maxx; FGM, Joinville, SC, Brasil) foi manipulado conforme as instruções do fabricante, e aplicado por 10 min. (2 aplicações consecutivas de 5 min. cada), sobre o esmalte da superfície vestibular do primeiro e segundo molares inferiores da hemi-mandíbula esquerda dos animais.

Nos períodos de 6 h, 24 h, 3 e 7 dias após o tratamento clareador, os animais foram sacrificados, as mandíbulas dissecadas *en bloc*, divididas ao meio e fixadas por 48 h em solução de formalina 10% (Labsynth Produtos para Laboratório, Diadema, SP, Brasil). Após desmineralização da maxila em ácido etilenodiamino tetra-acético 4.12% (EDTA) por

40 dias, as hemi-mandíbulas foram incluídas a vácuo em parafina líquida. Cortes seriados com seis micrômetros de espessura foram realizados (820 Spencer Microtome, Spencer Products Co. , Carson, CA,USA), os quais foram corados com hematoxilina e eosina (H&E), e tricrômico de Masson.

A análise microscópica do tecido pulpar foi realizada em microscópio de luz (62774, Carl Zeiss Inc., Oberkochen, Germany), sendo as análises feitas de modo cego por um único examinador. As lâminas foram avaliadas, descritas e os achados histológicos classificados de acordo com a Tabelas 2.

Tabela 2 – Achados histológicos e escores.

Achados Histológicos	Escore			
	0	1	2	3
Reação inflamatória	Nenhuma ou poucas células inflamatórias presentes na área pulpar correspondente à superfície vestibular do dente	Pequena presença de infiltrado inflamatório com polimorfonucleares (PMNs) ou leucócitos mononucleares (MNLs)	Moderado infiltrado inflamatório	Severo infiltrado inflamatório
Desorganização tecidual	Tecido normal	Camada odontoblástica desorganizada mas pulpa normal central	Necrose parcial da pulpa coronária associada com discreta desorganização do tecido pulpar remanescente	Necrose pulpar coronária associada ou não com calcificação distrófica

Resultados

A resposta pulpar observada nos dentes dos grupos cujos animais receberam ou não a administração de ácido ascórbico (AA) foi semelhante, tal como demonstrado na Tabela 3.

De maneira geral, os espécimes avaliados após seis horas de realização do tratamento clareador, tanto os grupos com administração prévia de AA como os grupos com uso de água destilada, exibiam polpa radicular preservada, porém com amplas áreas de alteração hialina e intensa proliferação de vasos sanguíneos. Todavia, a camada de odontoblastos se manteve intacta em toda extensão radicular. A análise da polpa coronária demonstrou que os cornos pulparem apresentavam necrose em toda extensão (Figura 1A/B/C).

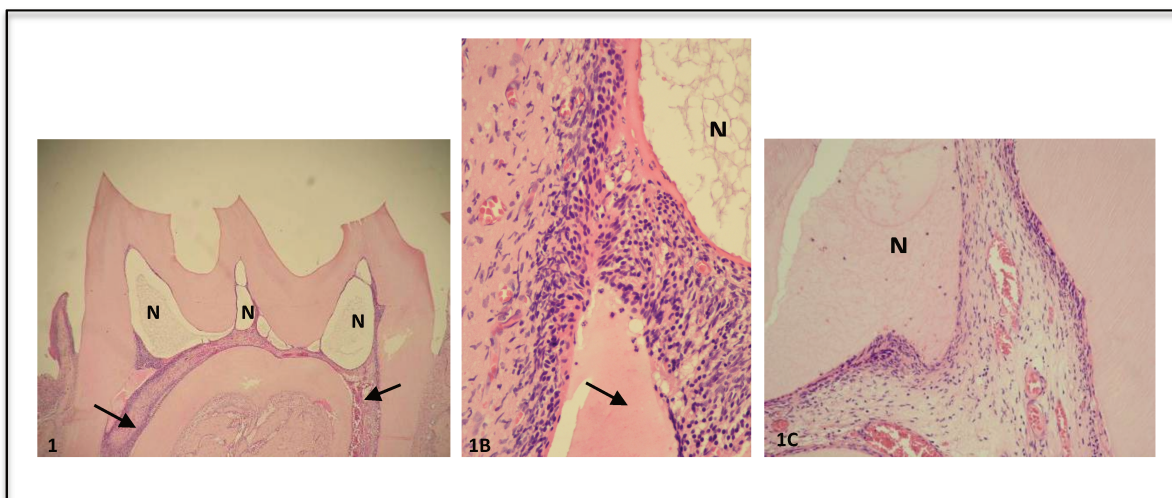


Figura 1: A. (Sem tratamento – 6 h) Vista geral dos cornos pulpare e parte da polpa coronária com necrose (N). A polpa radicular apresenta-se estruturalmente preservada (setas). H/E, 32x. B: Detalhe da figura anterior. Observe que adjacente a área de necrose (N) há intensa reação inflamatória com predomínio de macrófagos e presença de extravasamento de plasma sanguíneo (seta). H/E, 250x. C: Observe o corno pulpar de um molar de rato tratado com AA (6 horas). Parte do tecido está necrótico (N), sendo que adjacente pode-se observar polpa viável, porém com resposta inflamatória. H/E; 125x.

Apenas alguns dentes do grupo com aplicação prévia de ácido ascórbico apresentaram discreta área de necrose na região mais superior do corno pulpar, sendo que a maior parte da polpa radicular e coronária estava preservada (Figura 2A/B/C).

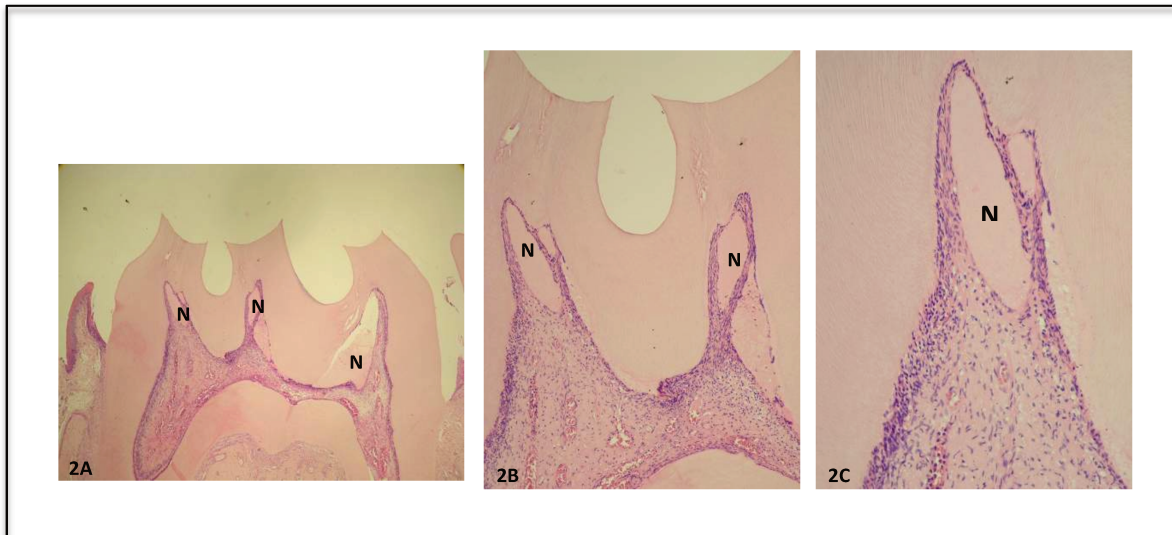


Figura 2: (Tratamento com AA – 6 h). Vista geral dos cornos pulpare. Parte da polpa coronária de um dos 3 cornos pulpare apresenta ampla necrose (N). Os demais cornos apresentam discretas áreas necróticas com característica hialina. H/E, 32x. B: Detalhe da figura anterior. Observe que ampla área de tecido pulpar coronário apresenta-se viável. H/E, 64x. C: Observe o corno pulpar de um molar de rato tratado com AA. Parte do tecido está necrótico (N), sendo que adjacente pode-se observar polpa viável, porém com resposta inflamatória. H/E; 125x.

Após 24 horas, a polpa coronária dos dentes submetidos ao tratamento clareador sem administração de AA apresentava intensa proliferação fibro-angioblástica com numerosos capilares ocupando grande parte dos cornos pulpare. As áreas mais superiores dos cornos pulpare estavam preenchidas por tecido conjuntivo frouxo, com a presença de macrófagos e neutrófilos. Apenas algumas células alongadas semelhantes a odontoblastos foram observadas adjacentes à dentina da região mais superior do corno pulpar (Figura 3A). Características histológicas semelhantes foram observadas para o grupo cujos animais foram submetidos ao tratamento com AA. Porém, um processo de reparação mais avançado ocorreu para este grupo (Figura 3B).

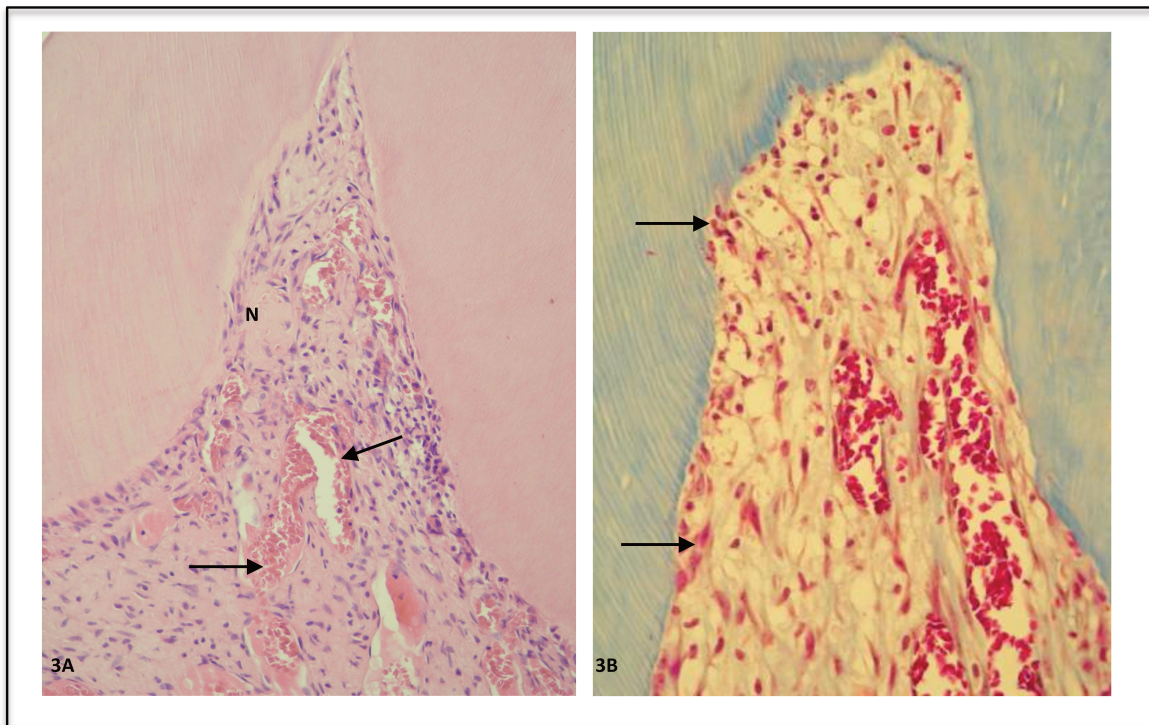


Figura 3: A. (Sem tratamento – 24 h) Corno pulpar com presença de reduzida área hialina, característica de tecido necrótico residual (N) entremeado por macrófagos. Observa-se proliferação fibro-angioblástica e numerosos vasos sangüíneos dilatados e congestionados (setas). H/E, 125x. B: Detalhe do corno pulpar de um molar em que o animal foi tratado com AA (24 h). Note a desorganização tecidual, com apenas algumas células alongadas semelhantes a odontoblastos revestindo parcialmente a dentina (setas). Numerosos vasos sangüíneos dilatados e congestionados são observado entre poucas células inflamatórias mononucleares. Tricrômico de Masson, 250x.

Com três dias de avaliação, a polpa coronária de todos os dentes submetidos ao tratamento clareador (placebo e AA) apresentava intensa proliferação fibro-angioblástica, com discreta presença de neutrófilos e macrófagos na região. A área do corno pulpar anteriormente necrótica estava quase que completamente ocupada por um

novo tecido pulpar altamente celularizado e com grande quantidade de capilares sanguíneos. Apenas para alguns dentes do grupo em que os animais não foram tratados com AA, observou-se discreta presença de áreas necróticas na região mais superior dos cornos pulpares (Figura 4A/B).

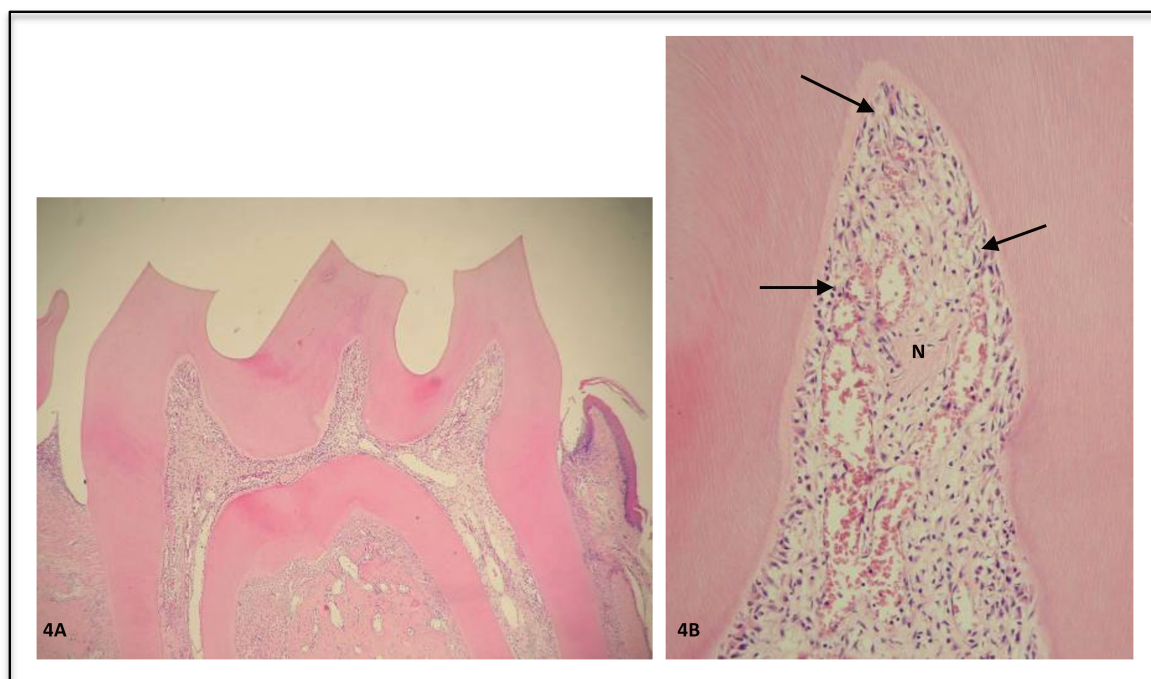


Figura 4: A. (AA – 3 dias) Vista geral dos cornos pulpares preenchidos por tecido pulpar viável. H/E, 32x. B. Detalhe da figura anterior. Observe que adjacente a área de necrose (N) há alguns macrófagos em meio a muitos vasos sanguíneos. Porém uma nova camada de células odontoblastóides reveste parcialmente a dentina (setas). H/E, 125x.

No período de 7 dias, foi observado que toda câmara coronária estava preenchida por um novo tecido conjuntivo pulpar altamente celularizado e vascularizado (Figura 5A/B/C). A dentina radicular e grande parte da dentina coronária estavam revestidas internamente por uma camada homogênea e contínua de odontoblastos.

Porém, uma reduzida quantidade de células alongadas semelhantes a odontoblastos foi observada nas regiões mais superiores dos cornos pulpaes. A polpa radicular apresentava características histológicas de normalidade.

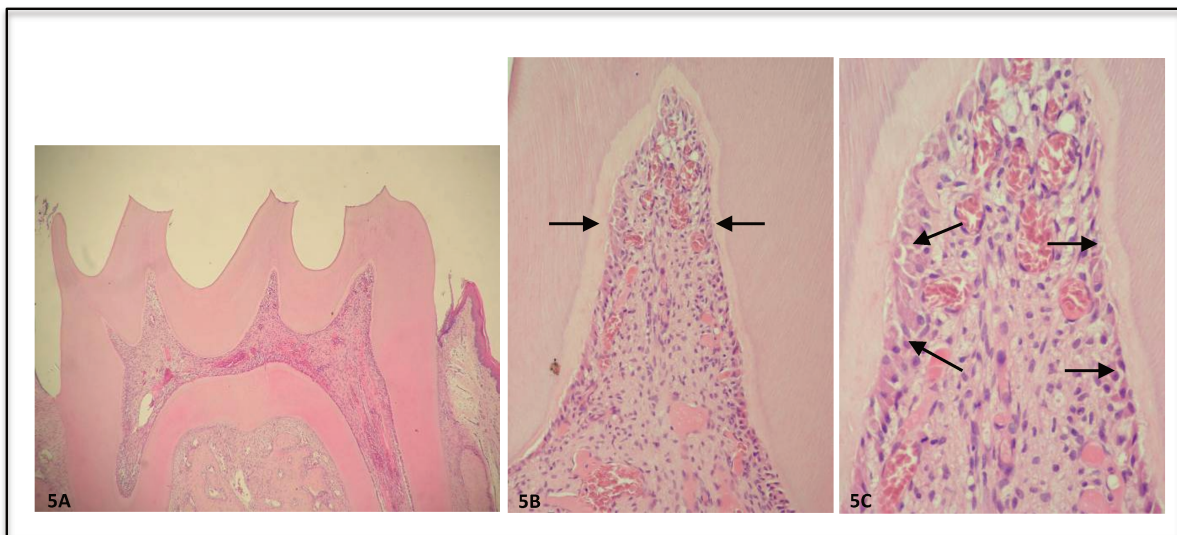


Figura 5: A. (Sem tratamento – AA 7 d) Vista geral dos cornos pulpaes ocupado por tecido pulpar viável. H/E, 32x. B. Detalhe da figura anterior, onde pode-se observar pre-dentina (setas) definida e presença de muitos capilares na região mais superior dos cornos pulpaes. H/E, 125x. C. Região mais superior do corno pulpar demonstrado na figura anterior. Note que a pré-dentina está revestida por células alongadas semelhantes a odontoblastos (setas), sendo que o tecido pulpar central está em fase final de reparação. H/E, 250x.

Para os grupos controle (sem aplicação de agente clareador), a polpa coronária e radicular apresentavam características de normalidade. Uma camada delicada e contínua de odontoblastos revestia internamente a dentina, sendo que a polpa subjacente exibia equilíbrio entre matriz extracelular e células pulpaes, em meio a discreta quantidade de vasos sanguíneos de variados diâmetros (Figura 6A/B).

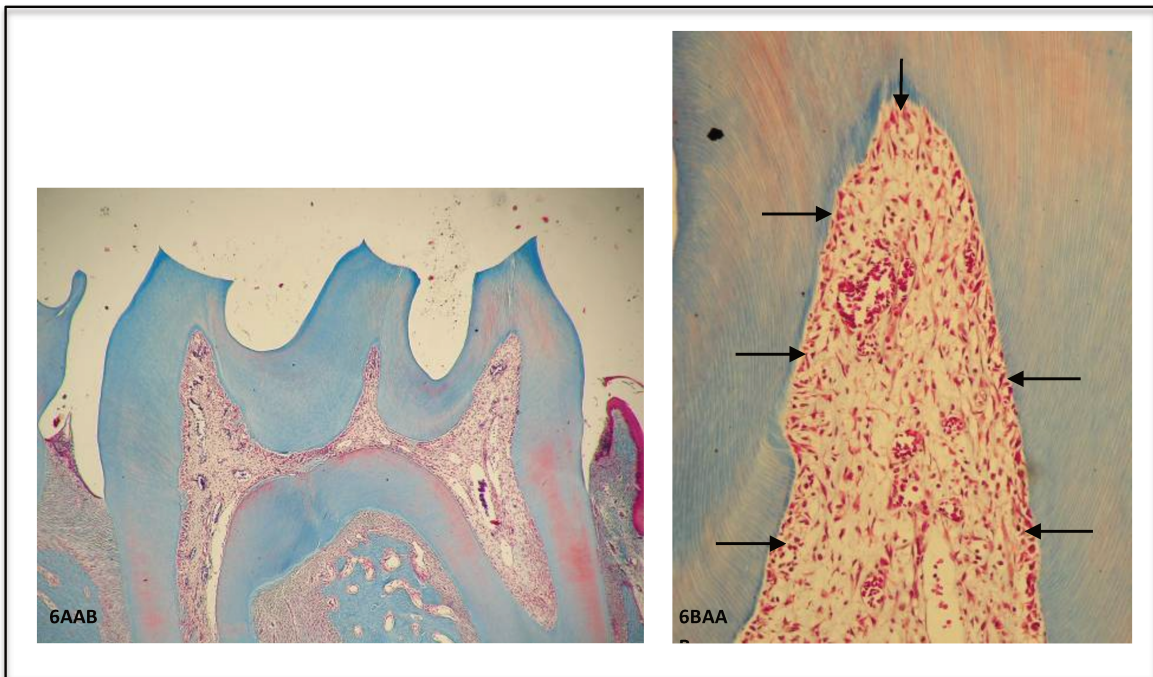


Figura 6: A. Vista geral dos cornos pulpaes com características histológicas de normalidade. Tricrômico de Masson, 32x. B. Detalhe de um dos cornos pulpaes da figura anterior. Observe que a camada de odontoblastos reveste internamente toda dentina (setas), sendo que a polpa subjacente apresenta equilíbrio entre células e matriz extracelular. Tricrômico de Masson, 125x.

Tabela 3. Número de dentes para cada grupo experimental, de acordo com o período de avaliação e tratamento realizado.

Achados histológicos	Grupos experimentais	Scores						Total
		0	1	1/2	2	2/3	3	
Resposta inflamatória	1 - PH 35% - 6 h	-	-	-	5	-	-	5
	2 - PH 35% - 24 h	-	-	3	5	-	-	8
	3 - PH 35% - 3 d	-	-	3	2	-	-	5
	4 - PH 35% - 7 d	-	-	1	3	-	-	4
	5 - AA + PH 35% - 6 h	-	-	3	5	-	-	8
	6 - AA + PH 35% - 24 h	-	-	3	2	-	-	5
	7 - AA + PH 35% - 3 d	-	1	4	2	-	-	7
	8 - AA + PH 35% - 7 d	-	2	1	1	-	-	4
Desorganização tecidual	1 - PH 35% - 6 h	-	-	-	-	-	5	5
	2 - PH 35% - 24 h	-	-	-	-	-	8	8
	3 - PH 35% - 3 d	-	-	3	2	-	-	5
	4 - PH 35% - 7 d	-	3	1	-	-	-	4
	5 - AA + PH 35% - 6 h	-	-	-	2	2	4	8
	6 - AA + PH 35% - 24 h	-	-	3	2	-	-	5
	7 - AA + PH 35% - 3 d	-	1	4	2	-	-	7
	8 - AA + PH 35% - 7 d	-	4	-	-	-	-	4

Discussão

O mecanismo de clareamento dental é baseado na ação oxidativa de espécies reativas de oxigênio (EROs), os quais são sub-produtos liberados pelos agentes clareadores, sobre cromóforos presentes no interior dos tecidos mineralizados dos dentes [20]. Porém, para que os EROs possam interagir com os cromóforos, eles necessitam se difundir pelo esmalte e dentina, sendo que alguns estudos têm demonstrado que estas espécies reativas podem alcançar a câmara pulpar [21, 22] e causar extensos danos para as células da polpa [5, 6, 8, 9, 23]. Mais recentemente, foi demonstrado que a difusão de EROs liberados de agentes clareadores de consultório podem ocasionar necrose parcial da câmara pulpar de incisivos humanos inferiores [10]. Na busca de prevenir ou pelo menos reduzir os efeitos deletérios causados pelos sub-produtos liberados dos agentes clareadores, estudos prévios *in vitro* analisaram a eficiência da aplicação de um agente antioxidante na proteção das células pulpares [6, 7].

Diante dos resultados positivos obtidos em cultura de células pulpares por estes pesquisadores, o presente estudo teve como proposta avaliar *in vivo* a resposta do tecido pulpar de dentes de ratos submetidos ao clareamento dental, quando estes animais receberam ou não administração prévia um agente antioxidante (ácido ascórbico - AA). Para isso, foi avaliado um agente clareador com elevada concentração de peróxido de hidrogênio (35% HP), o qual tem sido amplamente utilizado para realização do

clareamento dental em consultório. Porém, na presente pesquisa, o tempo de permanência do agente clareador em contato com a estrutura dentária (10 min) foi menor do que aquela recomendada para ser empregada clinicamente em dentes humanos (45 min). Esta redução no tempo de clareamento foi realizada com o objetivo de compensar a diferença na espessura do esmalte e dentina entre dentes humanos e de ratos. Para isso foi realizada uma relação entre espessura dentinária dos dentes humanos anteriores [10, 24] e tempo de exposição ao tratamento, transferindo proporção semelhante para a realização do tratamento clareador nos molares de rato.

Diante dos dados científicos obtidos na presente pesquisa, caracterizados pela ocorrência de necrose na região da polpa coronária após a realização do tratamento clareador, pode-se afirmar que a metodologia utilizada para avaliação do procedimento clínico em ratos foi adequada e validada, uma vez que os resultados obtidos foram semelhantes àqueles descritos em estudo prévio, no qual o tecido pulpar de incisivos inferiores humanos clareados com gel contendo 35% HP também apresentou necrose da polpa coronária [10].

Quanto à reação inflamatória, observou-se a mediação desta por macrófagos e neutrófilos em meio a um tecido conjuntivo frouxo, nas regiões adjacentes ao tecido necrótico (6h e 24 h de avaliação). Estas características de resposta do tecido pulpar foram observadas tanto nos grupos com administração prévia do ácido ascórbico, como no grupo controle (água destilada). Porém, os animais sem tratamento com AA apresentavam necrose pulpar de toda área coronária (6 h após tratamento), enquanto

que 3 dos 5 dentes dos animais que tiveram administração prévia de AA, apresentaram discreta necrose somente da região mais superior do corno pulpar (período de 6 h). Após 24 h, a diferença foi evidente entre os grupos com aplicação prévia do antioxidante, os quais exibiam apenas uma reduzida área de necrose na região mais superior do corno pulpar, sendo que o grupo sem uso do AA ainda mantinha ampla área de polpa coronária necrosada. Estes resultados indicam uma discreta tendência à maior velocidade no processo de reparação do tecido pulpar dos ratos que receberam administração prévia do AA.

Após 3 dias da realização do tratamento clareador, observou-se evidente reparação do tecido pulpar que anteriormente apresentava-se necrótico, sendo que este processo reparador estava praticamente finalizado no período de 7 dias do tratamento clareador. Neste período, o tecido pulpar apresentava-se altamente celularizado e vascularizado. De acordo com os dados científicos obtidos na presente pesquisa, ficou evidente que a partir do terceiro dia de efetuado o clareamento dental, a sequência de eventos histológicos subsequentes diferiu significativamente daquela descrita para dentes humanos. Enquanto o tecido necrótico da polpa coronária dos ratos evoluiu para sua substituição por um tecido ricamente celularizado e vascularizado, de Souza Costa et al. (2010) demonstraram que a polpa necrótica dos dentes humanos evoluiu para um processo de calcificação distrófica (de Souza Costa et al., 2010).

Estes autores relataram, ainda, que a área da polpa radicular dos dentes humanos clareados apresentava-se bastante reduzida devido a ampla deposição de

dentina terciária. Por outro lado, a polpa radicular dos dentes dos animais clareados não exibiam sinais de deposição de dentina terciária mesmo no período de 7 dias pós-tratamento.

Harada *et al.* (2008), demonstraram que o tecido pulpar de ratos Wistar, após sofrerem lesão causada pela realização do preparo cavitário em alta rotação, iniciam seu processo de reparação após o primeiro dia, no qual pode-se observar migração e diferenciação celular, sendo esta última etapa quase finalizada 2 dias após o estabelecimento da lesão pulpar. Diferente da presente pesquisa, os autores relataram a ocorrência de deposição de matriz dentinária pelas células odontoblastóides a partir do terceiro dia. Porém, tal como descrito por Harada *et al.* (2008), na presente pesquisa foi demonstrado que a reorganização tecidual associada a formação de células alongadas adjacente à dentina da região mais superior da polpa coronária teve início 3 dias após a lesão pulpar causada pelo procedimento clareador. Este processo de reparação pulpar estava quase completo no período de 7 dias após o clareamento. Estes dados demonstram que a diferenciação celular e reorganização tecidual, em ratos, mediada pela intensa proliferação de células tronco adultas, tal como demonstrado por Harada *et al.* (2008), pode acontecer quando a lesão pulpar é causada por diferentes procedimentos clínicos, tais como preparo cavitário e clareamento dental.

Tem sido descrito que as EROs liberadas pelos agentes clareadores podem difundir-se pelo esmalte e dentina causando um desequilíbrio entre os agentes oxidantes e antioxidantes, presentes no meio extracelular, acarretando extenso dano às células

pulpaes [8-10]. Este estresse celular pode ocasionar uma reação auto-catalítica de quebra de ligações duplas de ácidos graxos presentes na membrana plasmática, causando desde pequenos danos até morte celular [13]. Na presente pesquisa, a tentativa de reduzir os danos pulpaes por meio da administração de uma solução antioxidante foi baseada na hipótese de que um aumento dos níveis plasmáticos de agentes antioxidantes, tal como AA, poderia modular positivamente a resposta tecidual, eliminando, ou ao menos reduzindo os danos causados pelo componentes do gel clareador. Porém, neste estudo *in vivo*, o emprego de AA não foi capaz de prevenir ou evitar os danos pulpaes causados pelo procedimento clareador realizado. Isto provavelmente ocorreu devido à elevada toxicidade do agente clareador aplicado, o que pode ter resultado em ampla difusão de peróxido de hidrogênio e/ou sub-produtos de sua degradação, tais como os radicais hidroxila ($\text{OH}^\cdot$), acarretando em efeito deletério tão acentuado que impossibilitou a eficiente ação protetora do AA sobre as células pulpaes. Uma outra hipótese para a limitada ação protetora do agente antioxidante sobre as células da polpa dos ratos após o procedimento clareador é que a administração oral do AA não tenha sido capaz de aumentar significativamente o nível deste agente antioxidante no tecido pulpar. Este fato pode ter sido responsável pelos resultados semelhantes observados entre os grupos clareados, em que os animais foram tratados ou não com AA. No entanto, o menor dano pulpar observado após 6 e 24 h do tratamento clareador nos dentes dos animais que tiveram administração prévia do AA, torna a primeira hipótese mais provável.

Este é o primeiro estudo que avaliou a resposta do tecido pulpar de ratos após a realização do clareamento dental. Alguns fatores importantes, tais como tempo de exposição ao agente clareador, métodos e períodos de avaliação realizados no presente estudo, assim como os resultados obtidos frente às diferentes variáveis, serão importantes na realização de outros estudos que busquem determinar futuras técnicas de clareamento dental menos agressivas para o tecido pulpar.

Conclusões

Diante dos resultados do presente estudo, pode-se concluir que

- A realização do tratamento clareador com um agente de alta concentração (PH 35%) por um período de 10 min causou extenso dano à polpa dental de ratos Wistar, com áreas de necrose da câmara pulpar dos dentes tratados;
- O uso do ácido ascórbico previamente à aplicação do peróxido de hidrogênio 35% por 10 minutos não foi capaz de reduzir significativamente os danos causados pelo procedimento clareador.

Referências

- [1] Lima DA, Aguiar FH, Liporoni PC, Munin E, Ambrosano GM, Lovadino JR. In vitro evaluation of the effectiveness of bleaching agents activated by different light sources. *J Prosthodont* 2009;18:249-254.
- [2] Lima DA, Silva AL, Aguiar FH, Liporoni PC, Munin E, Ambrosano GM, et al. In vitro assessment of the effectiveness of whitening dentifrices for the removal of extrinsic tooth stains. *Braz Oral Res* 2008;22:106-111.
- [3] da Silva AP, Lima AF, Cavalcanti AN, Marchi GM. Effects of 3% sodium ascorbyl phosphate on the hardness and bond strength of human enamel bleached with 10% carbamide peroxide. *Gen Dent* 2010;58:e174-178.
- [4] Lima AF, Fonseca FM, Cavalcanti AN, Aguiar FH, Marchi GM. Effect of the diffusion of bleaching agents through enamel on dentin bonding at different depths. *Am J Dent* 2010;23:113-115.
- [5] de Lima AF, Lessa FC, Gasparoto Mancini MN, Hebling J, de Souza Costa CA, Marchi GM. Cytotoxic effects of different concentrations of a carbamide peroxide bleaching gel on odontoblast-like cells MDPC-23. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2009;90:907-912.
- [6] Lima AF, Lessa FC, Hebling J, de Souza Costa CA, Marchi GM. Protective Effect of Sodium Ascorbate on MDPC-23 Odontoblast-Like Cells Exposed to a Bleaching Agent. *Eur J Dent* 2010;4:238-244.

- [7] Lima AF, Lessa FC, Mancini MN, Hebling J, Costa CA, Marchi GM. Transdental protective role of sodium ascorbate against the cytopathic effects of H₂O₂ released from bleaching agents. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2010;109:e70-76.
- [8] Dias Ribeiro AP, Sacono NT, Lessa FC, Nogueira I, Coldebella CR, Hebling J, et al. Cytotoxic effect of a 35% hydrogen peroxide bleaching gel on odontoblast-like MDPC-23 cells. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2009;108:458-464.
- [9] Trindade FZ, Ribeiro AP, Sacono NT, Oliveira CF, Lessa FC, Hebling J, et al. Trans-enamel and trans-dental cytotoxic effects of a 35% H₂O₂ bleaching gel on cultured odontoblast cell lines after consecutive applications. *Int Endod J* 2009;42:516-524.
- [10] Costa CA, Riehl H, Kina JF, Sacono NT, Hebling J. Human pulp responses to in-office tooth bleaching. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2010;109:e59-64.
- [11] Kina JF, Huck C, Riehl H, Martinez TC, Sacono NT, Ribeiro AP, et al. Response of human pulps after professionally applied vital tooth bleaching. *Int Endod J* 2010;43:572-580.
- [12] Kawamoto K, Tsujimoto Y. Effects of the hydroxyl radical and hydrogen peroxide on tooth bleaching. *J Endod* 2004;30:45-50.
- [13] Halliwell B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol* 2006;141:312-322.
- [14] Hanks CT, Fat JC, Wataha JC, Corcoran JF. Cytotoxicity and dentin permeability of carbamide peroxide and hydrogen peroxide vital bleaching materials, in vitro. *J Dent Res* 1993;72:931-938.

- [15] Frei B, Stocker R, Ames BN. Antioxidant defenses and lipid peroxidation in human blood plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988;85:9748-9752.
- [16] Tomofuji T, Ekuni D, Sanbe T, Irie K, Azuma T, Maruyama T, et al. Effects of vitamin C intake on gingival oxidative stress in rat periodontitis. *Free Radic Biol Med* 2009;46:163-168.
- [17] Nandi D, Patra RC, Swarup D. Effect of cysteine, methionine, ascorbic acid and thiamine on arsenic-induced oxidative stress and biochemical alterations in rats. *Toxicology* 2005;211:26-35.
- [18] Patra RC, Swarup D, Dwivedi SK. Antioxidant effects of alpha tocopherol, ascorbic acid and L-methionine on lead induced oxidative stress to the liver, kidney and brain in rats. *Toxicology* 2001;162:81-88.
- [19] Ekuni D, Tomofuji T, Sanbe T, Irie K, Azuma T, Maruyama T, et al. Vitamin C intake attenuates the degree of experimental atherosclerosis induced by periodontitis in the rat by decreasing oxidative stress. *Arch Oral Biol* 2009;54:495-502.
- [20] Joiner A. The bleaching of teeth: a review of the literature. *J Dent* 2006;34:412-419.
- [21] Gokay O, Mujdeci A, Algin E. In vitro peroxide penetration into the pulp chamber from newer bleaching products. *Int Endod J* 2005;38:516-520.
- [22] Gokay O, Mujdeci A, Algin E. Peroxide penetration into the pulp from whitening strips. *J Endod* 2004;30:887-889.

- [23] Soares DG, Ribeiro AP, Sacono NT, Coldebella CR, Hebling J, Costa CA. Transenamel and transdental cytotoxicity of carbamide peroxide bleaching gels on odontoblast-like MDPC-23 cells. *Int Endod J* 2011;44:116-125.
- [24] Chandler NP. The radiographic assessment of pulp size: validity and clinical implications. *N Z Dent J* 1989;85:23-26.

CAPÍTULO 3

Efeito da terapia com laser em baixa potência na modulação da resposta de células odontoblastóides expostas a agentes clareadores

Resumo

O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito do laser de baixa potência (LBP) sobre células odontoblastóides MDPC-23 expostas ao peróxido de carbamida (CP 0,01% - 2.21µg/ml of H₂O₂). Para isto, células foram semeadas em placas de 24 poços (1.25 x 10⁴ cels/cm²) por 72 h. Oito grupos experimentais foram estabelecidos de acordo com a exposição ou não ao agente clareador e doses de energia de laser aplicadas sobre as células (0, 4, 10 e 15 J/cm²). Setenta e duas horas após o cultivo, as células foram expostas ao extrato contendo CP 0,01% por uma hora. Após esse período, o extrato foi substituído por um novo meio de cultura completo e as células submetidas a 3 irradiações com LBP (infra-vermelho próximo – InGaAsP -LASERTable; 780±3 nm, 40 mW), com intervalo de 24 h entre cada sessão. A exposição ao agente clareador causou redução estatisticamente significativa no metabolismo celular e atividade de fosfatase alcalina quando comparado aos grupos em que as células não foram expostas ao CP 0.01%

($p < 0,05$). De maneira geral, as irradiações com LBP não promoveram alterações no metabolismo celular (Tukey's Test, $p = 0,05$). No entanto, para a dose de $4\text{J}/\text{cm}^2$ observou-se aumento na atividade da fosfatase alcalina nos grupos com e sem exposição ao agente clareador, sendo esta atividade estatisticamente superior aos demais grupos (Tukey's Test, $p < 0,05$). Pode-se concluir que a exposição aos agentes clareadores causou redução no metabolismo celular e na atividade da fosfatase alcalina. A laserterapia não influenciou o metabolismo das células odontoblásticas, no entanto a dose de $4\text{J}/\text{cm}^2$ promoveu aumento da atividade da fosfatase alcalina, nos grupos com e sem exposição ao CP 0,01%.

Introdução

Atualmente, o clareamento dental caseiro pode ser realizado através do uso de géis contendo baixas concentrações de peróxido de carbamida (CP, 10-22%) ou de peróxido de hidrogênio (HP, 6-16%). Géis com altas concentrações de peróxido de hidrogênio (HP, 30-35%) ou de carbamida (CP, 35-37%) têm sido empregados no clareamento de consultório. O mecanismo de ação destes agentes clareadores dá-se pela oxidação das moléculas de pigmentos contidas na estrutura dental [1,2]. Esta degradação ocorre pela ação de subprodutos dos agentes clareadores, tais como os radicais hidroxila ($\text{OH}^\cdot$) e oxigênio singlet ($^1\text{O}_2$), os quais quebram os pigmentos em moléculas menores. Essa clivagem resulta em menor absorção de luz pelas estruturas dentárias, tornando a aparência dos dentes mais clara [2].

Devido ao fato do processo clareador ser mediado por radicais livres, os quais são capazes de se difundir pelo esmalte e dentina [3,4], tem sido demonstrado que o procedimento clareador pode promover alterações pulpareas que variam desde um leve quadro inflamatório [5] até danos irreversíveis ao tecido pulpar [6]. Devido aos efeitos deletérios causados pelos géis clareadores, os quais foram demonstrados tanto em estudos *in vitro* [7-11] quanto *in vivo* [6,5], tornou-se importante avaliar, neste momento, procedimentos que visem prevenir ou até mesmo eliminar os possíveis efeitos colaterais resultantes do clareamento dental. Dentro deste contexto, a terapia utilizando laser de baixa potência (LLLT) visando a diferenciação celular, o reparo tecidual e a diminuição de processos inflamatórios tem-se mostrado promissora [12-16]. Alguns pesquisadores demonstraram que a LLLT pode estimular a: 1) deposição de matriz de colágeno por fibroblastos [17]; 2) atividade mitocondrial e síntese de ATP [18]; e 3) proliferação de osteoblastos [19]. Estudos recentes também têm demonstrado que LLLT é capaz de promover aumento do metabolismo e síntese de proteína de células odontoblastóides MDPC-23, além de modular a atividade de fosfatase alcalina [20-22]. Estes efeitos positivos causados por parâmetros específicos de LLLT sobre odontoblastos são importantes, pois sabe-se que estas células pulpareas, as quais são responsáveis pela produção e mineralização da matriz dentinária, recobrem toda dentina coronária e pulpar, sendo, portanto, as primeiras a entrarem em contato com subprodutos dos materiais dentários capazes de se difundir pelos tecidos duros dos dentes [10,11]. Assim, pode-se hipotizar que a utilização do LBP sobre estas células expostas a agentes clareadores,

poderia promover uma bioestimulação celular e/ou auxiliar, clinicamente, no processo de reparação tecidual frente à agressão causada por componentes liberados dos produtos usados para clarear os dentes. Desta maneira, o objetivo do presente estudo foi analisar o efeito da LLLT sobre células odontoblastóides MDPC-23 expostas a um agente clareador.

Materiais e Métodos

As células odontoblastóides utilizadas no presente estudo foram gentilmente cedidas pelos professores Dr. Carl T. Hanks e Dr. Jacques E. Nör, da Universidade de Michigan, EUA. Células imortalizadas de linhagem odontoblástica MDPC-23 foram descongeladas e cultivadas em garrafas plásticas de 75 cm² (Costar Corp., Cambridge, MA, USA) em meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, SIGMA Chemical Co., St. Louis, MO, USA) contendo 10% de soro fetal bovino (SFB, Cultilab, Campinas, SP, Brasil), 100 IU/mL e 100 µg/mL, respectivamente, de penicilina e estreptomicina, e 2 mmol/L de glutamina (GIBCO, Grand Island, NY, USA). As células foram sub-cultivadas a cada 3 dias em incubadora (Isotemp Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA) com atmosfera umedecida contendo 5% de CO₂, 95% de ar e temperatura de 37°C, até que fosse obtido o número adequado de células para a pesquisa. As células foram então cultivadas (12.500 células/cm²) em placas contendo 24-poços (Costar Corp., Cambridge, MA, USA), e mantidas em incubadora com atmosfera umedecida contendo 5% de CO₂, 95% de ar e temperatura de 37°C.

Um gel clareador à base de peróxido de carbamida (PC) 10% (Whiteness, FGM, Joinville, SC, Brazil) foi diluído em meio de cultura (DMEM – 2% de soro fetal bovino – SFB) a fim de obter os extratos a serem aplicados sobre as células. Segundo estudo prévio [7], a solução utilizada no presente estudo possui 0,01% de PC (2,21 µg de peróxido de hidrogênio, aproximadamente), com a finalidade de simular a quantidade deste agente que se difunde pela estrutura dental atingindo a câmara pulpar, tal como demonstrado em estudos prévios [3,4,25]. Os grupos controle e experimental estão demonstrados na Tabela 1. As células foram expostas aos extratos por 1 h, e após este período, o meio condicionado foi removido e novo meio de cultura suplementado com SFB foi aplicado sobre as células. Após o término do tratamento, iniciou-se a irradiação laser das células, de acordo com as doses estabelecidas para cada grupo. As três irradiações laser foram realizadas com um intervalo de 24 h entre cada uma. O dispositivo para aplicação laser do presente estudo foi um sistema baseado no laser infra-vermelho próximo de índio-gálio-arseneto de fósforo (InGaAsP - LASERTable; 780 ± 3 nm 0.04W) . Vinte e quatro horas após a última irradiação, o metabolismo celular, assim como a atividade da fosfatase alcalina foram avaliados conforme descrito abaixo.

Tabela 1 – Grupos controles e experimentais de acordo com o protocolo estabelecido.

Grupos	PC 0,01%	Dose de energia	Laser	Número de aplicações
G1 (controle negativo)	Ausente	0	Ausente	0
G2 (control positivo)	Presente	0	Ausente	0
G3 (controle)	Ausente	4 J/cm ²	Presente	3
G4 (controle)	Ausente	10 J/cm ²	Presente	3
G5 (controle)	Ausente	15 J/cm ²	Presente	3
G6	Presente	4 J/cm ²	Presente	3
G7	Presente	10 J/cm ²	Presente	3
G8	Presente	15 J/cm ²	Presente	3

Análise do metabolismo celular

Dez poços por grupo foram utilizados para análise do metabolismo celular por demonstração citoquímica da atividade da desidrogenase succínica (DSU), que analisa a respiração mitocondrial empregando a técnica do metiltetrazolium, descrito previamente

por Mosmann (1983) e utilizada em diversos estudos [7,8,9,10]. As médias foram calculadas e analisadas estatisticamente.

Atividade de fosfatase alcalina (ALP).

Dez poços por grupo foram utilizados para avaliar a atividade da fosfatase alcalina, seguindo protocolo do Kit de Fosfatase Alcalina – Ensaio de Ponto Final (Labtest Diagnóstico S.A., Lagoa Santa, Minas Gerais, Brasil). Este ensaio utiliza o substrato de timolftaleína monofosfato, um substrato do éster do ácido fosfórico. A fosfatase alcalina hidrolisa a timolftaleína monofosfato liberando timolftaleína. Assim, é possível medir-se diretamente o produto da hidrólise, alterando-se o pH. O pH alterado promove a interrupção da atividade enzimática e a formação de cor azul característica do produto da reação, que é medida fotometricamente [23].

O meio de cultura foi aspirado e as células foram lavadas com PBS estéril a 37°C. Um mililitro de 0,1% de lauril sulfato de sódio (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) foi adicionado a cada poço e mantido por 30 minutos à temperatura ambiente, para provocar a lise celular. Após isso, 50 µL de substrato (timolftaleína monofosfato 22 mmol/L – reagente 1) e 500 µL de tampão (300mmol/L, pH 10,1 – reagente 2) foram adicionados a tubos Falcon. Trinta minutos após a lise celular, os tubos foram colocados em banho maria (Fanem, Guarulhos, SP, Brazil) a 37°C por 2 minutos. As amostras foram homogeneizadas e 50 µL de cada poço foi transferido para os tubos. Após 10 minutos de

incubação, 2 mL do reagente de cor (carbonato de sódio 94 mmol/L e hidróxido de sódio 250 mmol/L – reagente 3) foi adicionado à solução.

O teste de absorbância foi mensurado a 590 nm através de espectrofotômetro (Micronal B382, Sao Paulo, SP, Brazil).

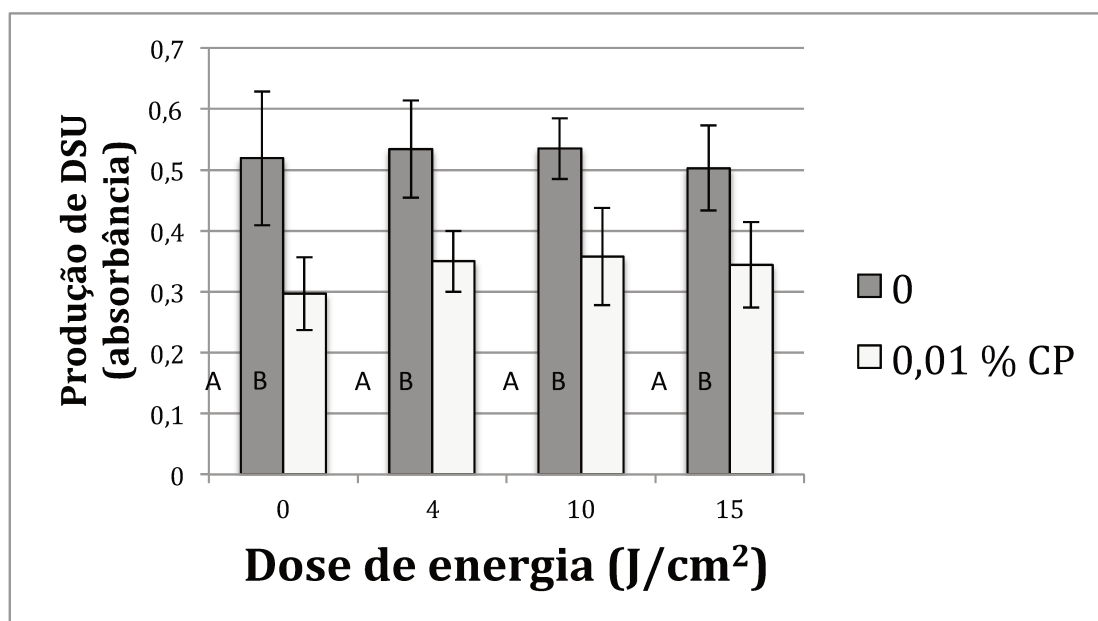
Análise estatística

Após análise exploratória dos dados a fim de avaliar a normalidade e homogeneidade das variâncias, os dados obtidos do teste de MTT e atividade da fosfatase alcalina foram submetidos à análise de variância a dois critérios (ANOVA two-way), sendo estes “exposição ao agente clareador” e “irradiação laser”. As comparações múltiplas foram realizadas pelo teste de Tukey, a um nível de significância de 5%.

Resultados

Os resultados obtidos na avaliação do metabolismo celular (produção de SDH) estão apresentados na Figura 1. Para os grupos em que o extrato contendo 0,01% de CP foi aplicado sobre as células em cultura, foi observado redução do metabolismo celular, sendo esta estatisticamente significativa em relação aos grupos cujas células não foram expostas ao agente clareador (grupo controle) (ANOVA two-way and Tukey's Test, $p < 0,05$). Não houve alteração no metabolismo das células irradiadas por 3 vezes com diferentes doses de energia, tanto para os grupos expostos ao agente clareador, quanto para os não expostos.

Figura 1 – Representação gráfica (absorbância) da produção de desidrogenase succínica em função dos grupos experimentais e controles



Letras diferentes indicam diferença estatística significativa (Teste de Tukey, $p < 0,05$)

Em relação à atividade da fosfatase alcalina, para os grupos em que as células odontoblastóides foram expostas ao agente clareador, pode-se observar uma redução na atividade desta proteína, quando comparados aos grupos não expostos a 0,01% CP (ANOVA two-way and Tukey's Test, $p < 0,05$). A irradiação com a dose de 4 J/cm² promoveu aumento na atividade da fosfatase alcalina, nas duas condições experimentais avaliadas (com e sem exposição ao agente clareador), sendo este aumento estatisticamente

significante em relação aos demais grupos ($p < 0,05$). Os resultados obtidos sobre a atividade da fosfatase alcalina podem ser observados na Tabela 2.

Tabela 2 – Médias da absorbância (absorbância, nm – U/L - desvio padrão) da atividade de ALP

Dose de energia	Agente Clareador	
	0	0,01% PC
0	1,97 (0,37) Ab	0,78 (0,31) Bb
4 J/cm ²	2,26 (0,48) Aa	1,38 (0,3) Ba
10 J/cm ²	1,74 (0,5) Ab	0,81 (0,14) Bb
15 J/cm ²	1,46 (0,3) Ab	0,79 (0,22) Bb

* Letras diferentes indicam diferença estatística significativa (Teste de Tukey $p < 0,01$). Letras maiúsculas comparam tratamento clareador. Letras minúsculas comparam protocolos de irradiação.

Discussão

Diante dos diversos estudos em que se demonstrou os possíveis efeitos deletérios *in vitro* do clareamento dental sobre células pulpares [7-11,24] e tecido pulpar de dentes humanos [6,5], a busca por novas técnicas que previnam ou pelo menos

possam reduzir os efeitos secundários negativos causados por componentes dos géis clareadores tem se tornado frequente.

Alguns procedimentos tem sido avaliados com o objetivo de tornar o clareamento dental menos agressivo para a polpa dental, tal como o uso de agentes antioxidantes [9,10]. Trabalhos recentes demonstraram êxito na redução dos efeitos tóxicos de componentes de géis clareadores quando do tratamento de células com ascorbato de sódio, um agente antioxidante capaz de inibir, mesmo que parcialmente, os efeitos deletérios causados pelas espécies reativas de oxigênio (EROs) liberadas dos géis clareadores [9,10]. No presente estudo, o emprego do laser após o procedimento clareador foi avaliada, com o objetivo de analisar se esta terapia poderia modular a resposta das células odontoblastóides frente à agressão causada pela exposição a um agente clareador.

Após exposição ao agente clareador, pôde-se observar significativa redução do metabolismo das células MDPC-23 (em torno de 35%), resultados esses corroborados por estudos anteriores [26,7,8]. Esta toxicidade pode ser resultado da quebra das ligações duplas dos ácidos-graxos da membrana plasmática das células, o que ocasiona ativação de endonucleases e proteases, aumento da permeabilidade e diminuição da fluidez da membrana, desencadeando a morte celular [27,28]. Na presente pesquisa, o tratamento das células MDPC-23 com três diferentes doses de energia de laser (4, 10 e 15 J/cm²), seguindo o protocolo de irradiação estabelecido, não influenciou no metabolismo das células odontoblastóides previamente expostas ou não ao agente clareador. Estes dados

diferem de estudos anteriores que demonstraram a influência positiva do laser de baixa potência no metabolismo de células osteoblásticas [19,29,30] e odontoblásticas [20,22], a modulação da atividade da fosfatase alcalina expressa por odontoblastos [21] e até mesmo aumento da viabilidade de fibroblastos expostos aos subprodutos dos agentes clareadores [31]. As diferenças existentes entre os resultados deste estudo e aqueles presentes na literatura dá-se pelos diversos protocolos de realização da laserterapia, assim como os diferentes parâmetros dos lasers (comprimento de onda, potência), e os tipos celulares avaliados; fatores que podem influenciar diretamente nos resultados obtidos [32].

Na presente pesquisa, além da redução no metabolismo celular, a exposição das células MDPC-23 aos extratos contendo componentes do gel clareador causou também diminuição na atividade da fosfatase alcalina. Estes resultados podem ser explicados pela interação entre os radicais livres formados e as cadeias protéicas, podendo acarretar a quebra da sequência de aminoácidos constituintes próximo ao centro ativo da molécula, fragmentando a proteína e reduzindo assim sua atividade [33].

Apesar da ausência de influência da LLLT sobre o metabolismo celular, a dose de $4\text{J}/\text{cm}^2$ foi capaz de aumentar a atividade da fosfatase alcalina nas células expostas ou não ao agente clareador. A LLLT pode agir de maneira diversa sobre os mecanismos metabólicos celulares, sendo que diferentes fatores podem desencadear as respostas celulares frente a irradiação com laser de baixa potência. É amplamente aceito que a ação da LLLT inicia-se na mitocôndria, mediada pela citocromo c oxidase [34]. A partir desta via,

inicia-se uma cascata de reações de sinalização celular, sendo uma delas a dissociação do óxido nítrico do centro catalítico da citocromo-c-oxidase [35,36], e outra através do aumento da síntese de ATP, acarretando um aumento do Ca^{2+} intracelular.

Tem sido demonstrado que o aumento dos níveis de Ca^{2+} extracelular pode causar um aumento do Ca^{2+} intracelular em osteoblastos, células com metabolismo semelhante às células odontoblásticas, e que esta alteração na disponibilidade de Ca^{2+} é acompanhada por um aumento da atividade da fosfatase alcalina [37,38]. Diante dos fatos apresentados, pode-se especular que a dose avaliada no presente estudo ($4\text{J}/\text{cm}^2$) causou aumento da síntese de ATP, acarretando uma maior quantidade de Ca^{2+} intracelular, aumentando consequentemente os valores da atividade de fosfatase alcalina nestes grupos.

No entanto, estes resultados positivos em relação à atividade da fosfatase alcalina foram obtidos somente nos grupos com a dose de $4\text{J}/\text{cm}^2$, sendo que estes resultados não foram observados com a exposição às doses de $10\text{J}/\text{cm}^2$ e $15\text{J}/\text{cm}^2$. Uma possível explicação para este fato é baseada no fenômeno denominado “dose resposta bifásico” ou “hormesis”, de acordo com a “Lei de Arndt-Schulz”. De acordo com esta lei, pequenos estímulos causam um ligeiro aumento na atividade celular, enquanto que maiores estímulos podem diminuir a intensidade destes efeitos, podendo até causar efeitos negativos sobre o metabolismo celular após a aplicação de altas doses de energia (Alghamdi KM, 2011).

Diante dos resultados obtidos no presente estudos e presentes na literatura [31], a LLLT pode representar uma alternativa para a modulação da resposta das células pulpares frente a agressão causada pela exposição aos agentes clareadores. Todavia, fatores como o número de aplicações, as diferentes doses de energia e outros parâmetros desta terapia podem influenciar a resposta celular, sendo que estas variáveis devem ser avaliadas em futuros estudos *in vitro* e *in vivo*.

Conclusões

Diante das condições experimentais e os resultados obtidos na presente pesquisa, foi possível concluir que a concentração de 0,01% de peróxido de carbamida causou efeitos tóxicos para as células odontoblastóides MDPC-23, como redução de metabolismo e de atividade da fosfatase alcalina. A fototerapia com o laser de baixa potência nas diferentes doses de energia testadas (4; 10; 15J/cm²) não foi capaz de modular o metabolismo das células MDPC-23 previamente agredidas por componentes do gel clareador avaliado; no entanto a dose de energia de 4J/cm² resultou em aumento da atividade de fosfatase alcalina, tanto nos grupos expostos ao agente clareador, como nos grupos submetidos apenas a irradiação.

Referências

1. Lima DA, Aguiar FH, Liporoni PC, Munin E, Ambrosano GM, Lovadino JR (2009) In vitro evaluation of the effectiveness of bleaching agents activated by different light sources. J Prosthodont 18 (3):249-254. doi:JOPR420 [pii]

10.1111/j.1532-849X.2008.00420.x
2. Kawamoto K, Tsujimoto Y (2004) Effects of the hydroxyl radical and hydrogen peroxide on tooth bleaching. J Endod 30 (1):45-50
3. Gokay O, Mujdeci A, Algin E (2005) In vitro peroxide penetration into the pulp chamber from newer bleaching products. Int Endod J 38 (8):516-520
4. Gokay O, Mujdeci A, Algin E (2004) Peroxide penetration into the pulp from whitening strips. J Endod 30 (12):887-889
5. Robertson WD, Melfi RC (1980) Pulpal response to vital bleaching procedures. J Endod 6 (7):645-649
6. Costa CA, Riehl H, Kina JF, Sacono NT, Hebling J (2010) Human pulp responses to in-office tooth bleaching. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 109 (4):e59-64. doi:S1079-2104(09)00916-0 [pii]

10.1016/j.tripleo.2009.12.002

7. de Lima AF, Lessa FC, Gasparoto Mancini MN, Hebling J, de Souza Costa CA, Marchi GM (2009) Cytotoxic effects of different concentrations of a carbamide peroxide bleaching gel on odontoblast-like cells mdpc-23. J Biomed Mater Res B Appl Biomater 90 (2):907-912. doi:10.1002/jbm.b.31362

8. Dias Ribeiro AP, Sacono NT, Lessa FC, Nogueira I, Coldebella CR, Hebling J, de Souza Costa CA (2009) Cytotoxic effect of a 35% hydrogen peroxide bleaching gel on odontoblast-like mdpc-23 cells. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 108 (3):458-464. doi:S1079-2104(09)00293-5 [pii]

10.1016/j.tripleo.2009.05.006

9. Lima AF, Lessa FC, Hebling J, de Souza Costa CA, Marchi GM (2010) Protective effect of sodium ascorbate on mdpc-23 odontoblast-like cells exposed to a bleaching agent. Eur J Dent 4 (3):238-244

10. Lima AF, Lessa FC, Mancini MN, Hebling J, Costa CA, Marchi GM (2010) Transdental protective role of sodium ascorbate against the cytopathic effects of h₂o₂ released from bleaching agents. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 109 (4):e70-76. doi:S1079-2104(09)00937-8 [pii]10.1016/j.tripleo.2009.12.020

11. Soares DG, Ribeiro AP, Sacono NT, Coldebella CR, Hebling J, Costa CA (2011) Transenamel and transdental cytotoxicity of carbamide peroxide bleaching gels on

odontoblast-like mdpc-23 cells. *Int Endod J* 44 (2):116-125. doi:10.1111/j.1365-2591.2010.01810.x

12. Soleimani M, Abbasnia E, Fathi M, Sahraei H, Fathi Y, Kaka G (2011) The effects of low-level laser irradiation on differentiation and proliferation of human bone marrow mesenchymal stem cells into neurons and osteoblasts-an in vitro study. *Lasers Med Sci*. doi:10.1007/s10103-011-0930-1

13. Nogueira GT, Mesquita-Ferrari RA, Souza NH, Artileiro PP, Albertini R, Bussadori SK, Fernandes KP (2011) Effect of low-level laser therapy on proliferation, differentiation, and adhesion of steroid-treated osteoblasts. *Lasers Med Sci*. doi:10.1007/s10103-011-1035-6

14. Mesquita-Ferrari RA, Martins MD, Silva JA, Jr., da Silva TD, Piovesan RF, Pavesi VC, Bussadori SK, Fernandes KP (2011) Effects of low-level laser therapy on expression of tnfr- α and tgfr- β in skeletal muscle during the repair process. *Lasers Med Sci* 26 (3):335-340. doi:10.1007/s10103-010-0850-5

15. Qadri T, Bohdanecka P, Tuner J, Miranda L, Altamash M, Gustafsson A (2007) The importance of coherence length in laser phototherapy of gingival inflammation: A pilot study. *Lasers Med Sci* 22 (4):245-251. doi:10.1007/s10103-006-0439-1

16. Re Poppi R, Da Silva AL, Nacer RS, Vieira RP, de Oliveira LV, Santos de Faria Junior N, de Tarso Camilo Carvalho P (2011) Evaluation of the osteogenic effect of low-level laser

therapy (808 nm and 660 nm) on bone defects induced in the femurs of female rats submitted to ovariectomy. *Lasers Med Sci* 26 (4):515-522. doi:10.1007/s10103-010-0867-9

17. Romanos GE, Pelekanos S, Strub JR (1995) Effects of nd:Yag laser on wound healing processes: Clinical and immunohistochemical findings in rat skin. *Lasers Surg Med* 16 (4):368-379

18. Karu TI, Pyatibrat LV, Kalendo GS, Esenaliev RO (1996) Effects of monochromatic low-intensity light and laser irradiation on adhesion of hela cells in vitro. *Lasers Surg Med* 18 (2):171-177

19. Khadra M, Lyngstadaas SP, Haanaes HR, Mustafa K (2005) Effect of laser therapy on attachment, proliferation and differentiation of human osteoblast-like cells cultured on titanium implant material. *Biomaterials* 26 (17):3503-3509

20. Oliveira CF, Basso FG, Lins EC, Kurachi C, Hebling J, Bagnato VS, Costa CAD (2010) Increased viability of odontoblast-like cells subjected to low-level laser irradiation. *Laser Phys* 20 (7):1659-1666. doi:Doi 10.1134/S1054660x10130153

21. Oliveira CF, Hebling J, Souza PP, Sacono NT, Lessa FR, Lizarelli RF, Costa CA (2008) Effect of low-level laser irradiation on odontoblast-like cells. *Laser Phys Lett* 5 (9):680-685

22. Tagliani MM, Oliveira CF, Lins EMM, Kurachi C, Hebling J, Bagnato VS, Costa CAD (2010) Nutritional stress enhances cell viability of odontoblast-like cells subjected to low level laser irradiation. *Laser Phys Lett* 7 (3):247-251. doi:Doi 10.1002/Lapl.200910137

23. Roy AV (1970) Rapid method for determining alkaline phosphatase activity in serum with thymolphthalein monophosphate. Clin Chem 16 (5):431-436

24. Trindade FZ, Ribeiro AP, Sacono NT, Oliveira CF, Lessa FC, Hebling J, Costa CA (2009) Trans-enamel and trans-dentinal cytotoxic effects of a 35% h₂O₂ bleaching gel on cultured odontoblast cell lines after consecutive applications. Int Endod J 42 (6):516-524. doi:10.1111/j.1365-2591.2009.01544.x [pii]

10.1111/j.1365-2591.2009.01544.x

25. Gokay O, Tuncbilek M, Ertan R (2000) Penetration of the pulp chamber by carbamide peroxide bleaching agents on teeth restored with a composite resin. J Oral Rehabil 27 (5):428-431

26. Coldebella CR, Ribeiro AP, Sacono NT, Trindade FZ, Hebling J, Costa CA (2009) Indirect cytotoxicity of a 35% hydrogen peroxide bleaching gel on cultured odontoblast-like cells. Braz Dent J 20 (4):267-274. doi:10.1590/S0103-64402009000400001 [pii]

27. Halliwell B (2006) Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. Plant Physiol 141 (2):312-322. doi:10.1104/pp.106.077073 [pii]

10.1104/pp.106.077073

28. Bellomo G, Mirabelli F (1987) Oxidative stress injury studied in isolated intact cells. Mol Toxicol 1 (4):281-293

29. Schwartz-Filho HO, Reimer AC, Marcantonio C, Marcantonio E, Jr., Marcantonio RA (2011) Effects of low-level laser therapy (685 nm) at different doses in osteogenic cell cultures. *Lasers Med Sci* 26 (4):539-543. doi:10.1007/s10103-011-0902-5
30. Aleksic V, Aoki A, Iwasaki K, Takasaki AA, Wang CY, Abiko Y, Ishikawa I, Izumi Y (2010) Low-level er:Yag laser irradiation enhances osteoblast proliferation through activation of mapk/erk. *Lasers Med Sci* 25 (4):559-569. doi:10.1007/s10103-010-0761-5
31. Dantas CM, Vivan CL, Ferreira LS, Freitas PM, Marques MM (2010) In vitro effect of low intensity laser on the cytotoxicity produced by substances released by bleaching gel. *Braz Oral Res* 24 (4):460-466. doi:S1806-83242010000400015 [pii]
32. Moore P, Ridgway TD, Higbee RG, Howard EW, Lucroy MD (2005) Effect of wavelength on low-intensity laser irradiation-stimulated cell proliferation in vitro. *Lasers Surg Med* 36 (1):8-12
33. Koyama I, Yakushijin M, Goseki M, Iimura T, Sato T, Sonoda M, Hokari S, Komoda T (1998) Partial breakdown of glycated alkaline phosphatases mediated by reactive oxygen species. *Clin Chim Acta* 275 (1):27-41. doi:S0009-8981(98)00069-2 [pii]
34. Karu TI (2010) Multiple roles of cytochrome c oxidase in mammalian cells under action of red and ir-a radiation. *IUBMB Life* 62 (8):607-610. doi:10.1002/iub.359

35. Karu TI, Pyatibrat LV, Afanasyeva NI (2004) A novel mitochondrial signaling pathway activated by visible-to-near infrared radiation. *Photochem Photobiol* 80 (2):366-372. doi:10.1562/2004-03-25-RA-123

2004-03-25-RA-123 [pii]

36. Sarti P, Giuffre A, Barone MC, Forte E, Mastronicola D, Brunori M (2003) Nitric oxide and cytochrome oxidase: Reaction mechanisms from the enzyme to the cell. *Free Radic Biol Med* 34 (5):509-520. doi:S0891584902013266 [pii]

37. Gabusi E, Manferdini C, Grassi F, Piacentini A, Cattini L, Filardo G, Lambertini E, Piva R, Zini N, Facchini A, Lisignoli G (2011) Extracellular calcium chronically-induced human osteoblasts effects: Specific modulation of osteocalcin and collagen type xv. *J Cell Physiol*. doi:10.1002/jcp.24001

38. Muller WE, Wang X, Diehl-Seifert B, Kropf K, Schlossmacher U, Lieberwirth I, Glasser G, Wiens M, Schroder HC (2011) Inorganic polymeric phosphate/polyphosphate as an inducer of alkaline phosphatase and a modulator of intracellular ca^{2+} level in osteoblasts (saos-2 cells) in vitro. *Acta Biomater* 7 (6):2661-2671. doi:S1742-7061(11)00119-X [pii]

10.1016/j.actbio.2011.03.007

CAPÍTULO 4

Efeito da irradiação laser sobre a viabilidade e expressão de proteínas dentinárias por odontoblastos expostos a agentes clareadores

Resumo

Objetivos: Avaliar os efeitos de uma aplicação do laser de baixa potência em células odontoblastóides expostas ou não a um agente clareador (AC) contendo peróxido de hidrogênio 35% . Métodos: células MDPC-23 foram semeadas (12.500 céls/cm^2) em placas de 24-poços e incubadas por 5 dias. Oito grupos foram estabelecidos de acordo com a exposição ao AC (sem tratamento, extrato obtido da difusão do AC) e dose de energia (sem irradiação, 4J/cm^2 ; 10J/cm^2 ; 15J/cm^2). Discos contendo esmalte e dentina adaptados em câmaras pulpareis artificiais foram alocados individualmente nos poços e o AC foi aplicado no esmalte (15 min) para obtenção dos extratos (meio de cultura+componentes de AC difundidos pelo esmalte/dentina). Os extratos foram aplicados sobre as células (1h) e após, submetidos à irradiação laser. O metabolismo celular (MTT) atividade de fosfatase alcalina (ALP), como também a análise da expressão gênica através de PCR em tempo real de ALP, fibronectina (FN) e colágeno-I (COL-I) foram

avaliados. Dados obtidos através do PCR foram analisados através de ANOVA a dois critérios e teste Tukey ($\alpha=0,05$). MTT e atividade de ALP foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis e Dunn ($\alpha=0,05$). Resultados: O procedimento clareador causou redução do metabolismo, atividade de ALP e da expressão gênica de ALP, FN e COL-I. A laserterapia não modulou o metabolismo celular, expressão de ALP, COL-I e atividade de ALP. No entanto, reduziu a expressão gênica de FN no grupos sem exposição ao clareamento. Conclusões: De acordo com a metodologia utilizada no presente estudo, pode-se concluir que o agente clareador com 35% de peróxido de hidrogênio reduziu o metabolismo das células MDPC-23, assim como a atividade e expressão de proteínas dentinárias. As diferentes doses de energia não bioestimularam as células expostas ao AC.

Introdução

O clareamento dental tem sido amplamente estudado nos últimos anos, sendo a toxicidade deste tratamento sobre as células pulpares considerada um dos principais tópicos abordados nos diversos estudos [1-7]. Devido ao mecanismo de ação dos agentes clareadores, espécies reativas de oxigênio (EROs) difundem-se pela estrutura dental, interagindo com as moléculas de pigmento, tornando o aspecto dos dentes mais brancos e claros [8]. No entanto, esta difusão é inespecífica, sendo que além da atuação em esmalte e dentina, as EROs atingem o espaço pulpar [9, 10] podendo desta maneira, causar danos às células que constituem o tecido pulpar.

Diante dos resultados demonstrados na literatura, baixas concentrações dos agentes clareadores podem causar extensos danos celulares, como observados em macrófagos [11], fibroblastos [12, 13] e odontoblastos [2-4, 7]. Os odontoblastos tem sido amplamente utilizados no estudo da biocompatibilidade dos agentes clareadores por serem as primeiras células a entrarem em contato com os subprodutos difundidos pelo esmalte e dentina que atingem a câmara pulpar, propiciando importantes dados acerca da toxicidade destes produtos [2, 7].

A toxicidade dos agentes clareadores é demonstrada não só em estudos *in vitro*, mas também em estudos *in vivo* [1, 14], cujos resultados destacam desde uma leve inflamação [14] até a necrose da porção coronária do tecido pulpar de incisivos centrais inferiores humanos [1]. Diante dos danos observados em estudos *in vitro* e *in vivo*, faz-se necessário a avaliação de meios que possam modular a resposta celular frente à agressão causada pelos agentes clareadores, a fim de reduzir os efeitos colaterais causados por este tratamento à polpa dental.

A laserterapia tem apresentado resultados interessantes em relação à modulação das respostas celulares, como aumento da síntese de ATP (Karu, et al., 1995), proliferação de osteoblastos (Khadra et al., 2005), aumento da atividade da fosfatase alcalina em odontoblastos (Oliveira, 2010), e aumento do metabolismo celular de fibroblastos expostos a agentes clareadores [12]. Em outro estudo, apesar da ausência de influência sobre o metabolismo celular, resultados positivos foram observados em odontoblastos expostos a agentes clareadores quando submetidos a três irradiações do

laser de baixa potência, com o aumento da atividade da fosfatase alcalina sintetizada por estas células (Lima et al. resultados não publicados). O objetivo da aplicação da laserterapia sobre o tecido pulpar após o clareamento seria modular a resposta celular, aumentando a capacidade de recuperação desse tecido após a agressão causada pelos subprodutos clareadores difundidos pela estrutura dental.

A laserterapia tem sido indicada como tratamento para a hipersensibilidade dental, efeito colateral observado em muitos casos em que o clareamento dental é realizado [15, 16]. No entanto, não há evidência científica acerca da efetividade da irradiação laser na biomodulação positiva de células pulpares após exposição ao agente clareador. Diante do exposto, a proposta do presente estudo foi avaliar o efeito de uma aplicação do laser de baixa potência sobre células odontoblastóides MDPC-23 expostas a um agente clareador, por meio da análise do metabolismo celular, atividade de fosfatase alcalina e expressão gênica de colágeno tipo I (Col-I), fosfatase alcalina (ALP) e fibronectina (FN).

Materiais e Métodos

Cultura das células MDPC-23

As células odontoblastóides utilizadas no presente estudo foram gentilmente cedidas pelo Dr. Carl T. Hanks and Dr. Jacques E. Nör, da Universidade de Michigan, EUA. Células imortalizadas de linhagem odontoblástica MDPC-23 foram descongeladas e cultivadas em garrafas plásticas de 75 cm² (Costar Corp., Cambridge, MA, USA) em meio

de cultura Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, SIGMA Chemical Co., St. Louis, MO, USA) contendo 10% de soro fetal bovino (SFB, Cultilab, Campinas, SP, Brasil), 100 IU/mL e 100 µg/mL, respectivamente, de penicilina e estreptomicina, e 2 mmol/L de glutamina (GIBCO, Grand Island, NY, USA). As células foram sub-cultivadas a cada 3 dias em incubadora (Isotemp Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA) com atmosfera umedecida contendo 5% de CO₂, 95% de ar e temperatura de 37°C, até que fosse obtido o número adequado de células para a pesquisa. As células foram então cultivadas (15.000 células/cm²) em placas contendo 24-poços (Costar Corp., Cambridge, MA, USA), e mantidas em incubadora com atmosfera umedecida contendo 5% de CO₂, 95% de ar e temperatura de 37°C.

Confecção dos discos de esmalte-dentina

Duzentos e oito discos contendo esmalte e dentina foram obtidos a partir de incisivos bovinos. Estes dentes foram utilizados, por permitirem a obtenção de espessura adequada e superfície planificada do esmalte, assim como de dentina, proporcionando o dimensionamento ideal para acomodação na câmara pulpar artificial (CPA) utilizada no experimento. Para obtenção dos discos, os dentes foram limpos e armazenados em solução de timol 0,1%. Após isso, foram examinados em lupa estereoscópica (Meiji 200, Meiji Techno, Japão), com 20× de aumento, para assegurar a ausência de defeitos ou trincas que possam alterar os resultados.

Cada dente foi fixado em placas de acrílico, com o auxílio de cera pegajosa, e acoplados em cortadeira metalográfica de precisão (ISOMET 1000, Buehler Ltda., Lake Bluf, IL, USA), a fim de se obter um fragmento de esmalte e dentina na forma de um quadrado com 1 cm de lado.

Após a obtenção dos fragmentos, a superfície de dentina foi planificada utilizando-se lixas de papel abrasivo de óxido de alumínio de granulação 600 e 1200 (Arotec Ind. Com. Ltda., Cotia, São Paulo, Brasil), sob refrigeração constante. A planificação das superfícies foi realizada de modo a obter-se uma espessura de aproximadamente 1,6 mm de dentina [17], e 1,5 mm de esmalte, medidas padronizadas e confirmadas, através do uso de um paquímetro digital (Mitutoyo SulAmericana, São Paulo, SP, Brasil).

Após planificação e padronização dos fragmentos, estes foram desgastados utilizando broca trefina (5 mm de diâmetro), acoplada a uma peça reta de baixa rotação. Os fragmentos foram cortados, sob refrigeração constante, obtendo-se discos de esmalte/dentina com diâmetro padronizado em 5 mm, para adaptação na câmara pulpar artificial (CPA). Esse dispositivo foi desenvolvido no Laboratório de Patologia Experimental e Biomateriais da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP.

Solução de EDTA 0,5M (pH 7,2) foi aplicada sobre os discos por 30s [18], com o objetivo de limpeza superficial e remoção da *smear layer*, promovendo a desobstrução

dos túbulos dentinários. Após isso, a solução de EDTA foi lavada das superfícies dos discos através da aplicação, por 60 segundos, de água deionizada.

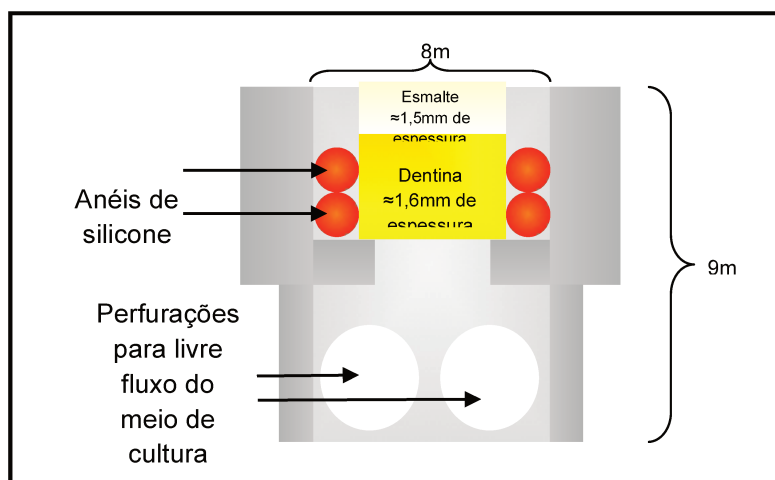


Figura 2 - Desenho esquemático da câmara pulpar artificial. O disco de esmalte/dentina é posicionado entre os anéis de vedamento (silicone), sendo que a superfície de esmalte, no qual os agentes foram aplicados, está voltada para cima. A superfície pulpar do disco (dentina), está voltada para baixo e em contato com o meio de cultura.

Procedimento clareador e irradiação das células

Após divisão aleatória dos discos entre os grupos experimentais e controles, os discos foram fixados nas CPAs, em meio a dois anéis de silicone esterilizados (Orion – São Paulo, SP, Brasil), os quais além de acomodarem o disco em posição, impediram que os

materiais clareadores, quando aplicados, alcançassem o meio de cultura através das bordas laterais do disco. Os grupos experimentais e controles, estabelecidos de acordo com o número de discos de esmalte/dentina e condições experimentais estão demonstrados na Tabela 1.

Tabela 1: Relação entre grupos experimentais e controles de acordo com o número de amostras e tipo de tratamento dos discos de dentina (experimento 2).

Grupos	Clareamento (peróxido de hidrogênio - PH 35%)	Densidade de energia	Laser	Nº de aplicações
G1 Controle	Ausente	0	Ausente	0
G2 Controle	Presente	0	Ausente	0
G3	Ausente	4 J/cm ²	Presente	1
G4	Ausente	10 J/cm ²	Presente	1
G5	Ausente	15 J/cm ²	Presente	1
G6	Presente	4 J/cm ²	Presente	1
G7	Presente	10 J/cm ²	Presente	1
G8	Presente	15 J/cm ²	Presente	1

Após esterilização das CPAS contendo os discos de dentina utilizando óxido de etileno, os procedimentos foram realizados. Para o tratamento clareador, as CPAs foram individualmente posicionadas em placas estéreis de 24-poços, contendo 1 mL de meio de cultura sem soro fetal bovino (DMEM-SFB). As superfícies do disco foram lavadas com 1 mL de água deionizada estéril, secas com papel absorvente e então o tratamento clareador foi realizado para a obtenção dos extratos. O tratamento clareador foi realizado utilizando o peróxido de hidrogênio 35% (Whiteness HP, FGM Produtos Odontológicos,

Joinville, SC, Brasil). O produto foi manipulado de acordo com as instruções do fabricante, aplicado sobre a superfície do esmalte, e mantido por 15 min. Após este período, o gel foi aspirado e a superfície lavada com água destilada deionizada estéril. Após a lavagem, as CPAs foram removidas dos respectivos poços, e 500 µL do extrato obtido (subprodutos dos agentes clareadores difundidos pelo fragmento de esmalte-dentina) foram aplicados sobre as células odontoblásticas e mantidos em contato por 1 h.

Após este período, o extrato foi removido, novo meio de cultura suplementado com SFB foi aplicado sobre as células, e então foi realizada a irradiação, de acordo com o protocolo estabelecido para cada grupo.

O dispositivo de irradiação laser utilizado no presente estudo foi um sistema baseado em diodos laser de Índio Gálio Arseneto de Fósforo (InGaAsP - LASERTable; 780±3 nm 0.025W). O dispositivo foi desenvolvido com capacidade para doze diodos, e um conjunto de lentes que propiciam a irradiação individualizada e uniforme de cada poço, sem interferência na irradiação do poço adjacente.

Foram selecionadas 3 doses de irradiação – 4, 10 e 15J/cm² [19]. A irradiação foi realizada 1 hora após o procedimento clareador, sendo realizada apenas 1 sessão. Vinte e quatro horas após a irradiação, as avaliações de metabolismo celular, atividade da fosfatase alcalina e expressão de proteínas dentinárias foram realizadas.

Todo o experimento foi realizado em triplicata, para confirmação dos resultados obtidos em cada análise.

Análise do metabolismo celular (MTT)

Após o tratamento clareador e irradiação das células de acordo com o protocolo estabelecido na Tabela 1, 10 poços por grupo foram utilizados para análise do metabolismo celular por demonstração citoquímica da atividade da desidrogenase succínica (DSU), que analisa a respiração mitocondrial empregando a técnica do metiltetrazolium, descrito previamente por Mosmann (1983) e utilizada em diversos estudos [2-5, 7]. Para análise dos resultados, os valores de absorbância de cada grupo foram expressos em porcentagem, representando porcentagem da viabilidade celular. O controle negativo (G1) foi definido como 100% de viabilidade.

Atividade de fosfatase alcalina (ALP)

Dez compartimentos por grupo foram utilizados para avaliar a atividade da fosfatase alcalina, seguindo protocolo do Kit de Fosfatase Alcalina – Ensaio de Ponto Final (Labtest Diagnóstico S.A., Lagoa Santa, Minas Gerais, Brasil). Este ensaio utiliza o substrato de timolftaleína monofosfato, um substrato do éster do ácido fosfórico. A fosfatase alcalina hidrolisa a timolftaleína monofosfato liberando timolftaleína. Assim, é possível medir-se diretamente o produto da hidrólise, alterando-se o pH. O pH alterado promove a interrupção da atividade enzimática e a formação de cor azul característica do produto da reação, que é medida fotometricamente [20].

O meio de cultura foi aspirado e as células foram lavadas com PBS estéril a 37°C. Um mililitro de 0,1% de lauril sulfato de sódio (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) foi adicionado a cada poço e mantido por 30 minutos à temperatura ambiente, para provocar a lise celular. Então, 50 µL de substrato (timolftaleína monofosfato 22 mmol/L – reagente 1) e 500 µL de tampão (300mmol/L, pH 10,1 – reagente 2) foram adicionados a tubos Falcon. Trinta minutos após a lise celular, os tubos foram colocados em banho-maria (Fanem, Guarulhos, SP, Brazil) a 37°C por 2 minutos. As amostras foram homogeneizadas e 50 µL de cada poço foi transferido para os tubos. Após 10 minutos de incubação, 2 mL do reagente de cor (carbonato de sódio 94 mmol/L e hidróxido de sódio 250 mmol/L – reagente 3) foi aderido à solução.

O teste de absorbância foi mensurado a 590 nm através de espectrofotômetro (Micronal B382, Sao Paulo, SP, Brazil).

Análise da expressão gênica por PCR em tempo real

Seis poços por grupo foram utilizados para a avaliação da expressão de proteínas dentinárias após os tratamentos propostos pelo presente estudo. Os protocolos utilizados para esta avaliação foram realizados segundo descrito por Basso et al., (2011).

Extração de RNA e Síntese de cDNA

As células foram transferidas para tubo de microcentrifuga, ao qual foi adicionado 1mL de Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) para inibir a ação de RNAases - e

incubado por 5min à temperatura ambiente. Após este período, foram adicionados, para cada 1,0mL de Trizol, 0,2mL de clorofórmio (Sigma – Aldrich, St Louis, MO, USA) para promover a liberação das proteínas citoplasmáticas.

Os tubos foram submetidos à agitação manual por 15 segundos mantidos à temperatura ambiente por 2 a 3 minutos. A seguir, as amostras foram centrifugadas a 1200rcf (Microcentrifuga Eppendorf modelo 5415R, Hamburg, Germany) por 15 minutos a 4°C. Após a centrifugação, estas amostras se apresentaram divididas em três fases, uma fase precipitada, correspondente à porção orgânica (fenol, clorofórmio, DNA), uma fase intermediária (proteínas) e uma fase mais aquosa sobrenadante, correspondente ao RNA (RNA e tampão).

A fase aquosa foi aliqüotada para um novo tubo, no qual, para cada 1,0mL de Trizol utilizado foi adicionado 0,5mL de Isopropanol (Sigma – Aldrich, St Louis, MO, USA) para promover a precipitação do RNA em solução.

As amostras foram mantidas à temperatura ambiente por 10 minutos e, a seguir, centrifugadas a 12.000 rcf por 10 minutos a 4°C. Após esta etapa, foi observada a formação de uma fração precipitada (pellet) no fundo do tubo.

A parte sobrenadante do tubo foi descartada e a fração precipitada foi seca através da inversão dos tubos em papel por 10 minutos.

Após a secagem do RNA obtido, foram adicionados, para cada 1.0 mL de Trizol, 1.0 mL de etanol 75% (Sigma – Aldrich, St Louis, MO, USA) e as amostras foram colocadas em agitação e centrifugadas a 7.500 rcf por 5 minutos a 4°C.

A fração sobrenadante obtida foi descartada e o RNA submetido ao mesmo procedimento de secagem previamente descrito, por 30 minutos.

Após este período o RNA foi ressuspensão em 10µL de água ultrapura (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) e a solução obtida foi incubada por 10 minutos a 55°C.

Parte do RNA obtido (1,0 mL) foi diluído em água ultrapura, na proporção de 1:50, para a realização da quantificação do RNA em Biofotômetro (Biophotometer Eppendorf – modelo Eppendorf RS – 232C, Hambur, Germany).

Para cada amostra de RNA obtida foi sintetizado o cDNA, para a realização do qPCR. Esse protocolo foi realizado utilizando High Capacity cDNA Reverse Transcriptions Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), seguindo o protocolo abaixo descrito.

Em um tubo de microcentrífuga foram adicionados 10x RT Buffer, 10X RT Random Primers, 25X dNTP Mix, transcriptase reversa 0,5ug do RNA de cada amostra. A seguir, as amostras foram submetidas ao ciclo de amplificação, de 25°C (10min), 37° (120min), 85°C (5 seg), 4°.

qPCR

Após a síntese de cDNA, foi avaliada a expressão dos genes que codificam Colágeno Tipo I (col1), Fosfatase Alcalina (ALP) e Fibronectina (FN) através do PCR quantitativo. Para cada gene, foram sintetizados primers específicos, a partir da sequência de mRNA.

As reações foram preparadas com reagentes padronizados para PCR em tempo real Syber Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), adicionado dos conjuntos de *primers* específicos para cada gene (Tabela 2).

As leituras da fluorescência foram realizadas pelo equipamento Step One Plus (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) a cada ciclo de amplificação e, posteriormente, analisados pelo Step One Software 2.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Todas as reações foram submetidas às mesmas condições de análise e normalizadas pelo sinal do corante de referência passiva ROX para correção de flutuações na leitura decorrentes a variações de volume e evaporação ao longo da reação. O resultado, expresso em valor de CT, se refere ao número de ciclos de PCR necessários para que o sinal o fluorescente atinja o limiar de detecção. Os resultados individuais expressos em valores de CT foram a seguir transferidos para planilhas e agrupados de acordo com os grupos experimentais, sendo então normalizados de acordo com a expressão do gene endógeno selecionado (β Actina). A seguir, as concentrações de RNAm de cada gene alvo foi avaliada estatisticamente.

Tabela 2. Sequências dos *primers* utilizados para a análise de expressão gênica das células odontoblastóides submetidas ao agente clareador e os diferentes protocolos de irradiação laser

Gene	Sequências <i>Primers</i>
<i>Col-I</i>	<i>Foward</i> – 5' ACG TCC TGG TGA AGT TGG TC 3' <i>Reverse</i> – 5' CAG GGA AGC CTC TTT CTC CT 3'
<i>ALP</i>	<i>Foward</i> -5' GCT GAT CAT TCC CAC GTT TT 3' <i>Reverse</i> – 5' CTG GGC CTG GTA GTT GTT GT 3'
<i>FN</i>	<i>Foward</i> -5' CTG GGG TCT ACT CCA CCG AA 3' <i>Reverse</i> – 5' GCC AAG ATT CAG AGA CCC GG 3'
<i>βActina</i>	<i>Foward</i> – 5' AGC CAT GTA CGT AGC CAT CC 3' <i>Reverse</i> – 5' CT CTC AGC TGT GGT GGT GAA 3'

Análise estatística

Todos os resultados obtidos foram avaliados quanto à sua distribuição normal e homocedasticidade dos dados. Os dados numéricos obtidos nas análises de viabilidade celular e atividade da fosfatase alcalina, que não apresentaram distribuição normal, foram analisados através dos testes de Kruskal-Wallis e teste de Dunn, a um nível de significância de 5%. Os resultados obtidos da expressão de proteínas dentinárias através de PCR em

tempo real foram analisados através da Análise de Variância a dois critérios e teste de Tukey, a um nível de significância de 5%.

Resultados

Análise do metabolismo celular (MTT)

Diante dos resultados obtidos, pode-se observar que o clareamento dental causou uma redução significativa no metabolismo das células odontoblastóides MDPC-23 (Kruskal-Wallis e Dunn Test, $p < 0,05$), promovendo uma redução no metabolismo em torno de 40-60%, para todos os grupos expostos aos subprodutos desse procedimento (Tabela 3). Além disso, os diferentes protocolos de irradiação avaliados não influenciaram o metabolismo celular das células odontoblastóides, exceto para o grupo exposto aos subprodutos do agente clareador, submetido a irradiação com 15 J/cm^2 , que apresentou resultados inferiores ao controle positivo. Os demais grupos, expostos ou não aos agentes clareadores, mantiveram os valores de viabilidade celular semelhante aos grupos sem realização de irradiação laser (Kruskal-Wallis e Dunn Test, $p > 0,05$).

Tabela 3 - Medianas (mínimo; máximo) do metabolismo celular (%) de acordo com os grupos experimentais e controle.

Irradiação Laser	Clareamento	
	Ausente	PH 35%
0	97,56 (85,46; 115,6) Aa	60,22 (50,55; 68,77) Ba
4 J/cm²	101,67 (70,75; 114,12) Aa	49,38 (45,84; 57,62) Ba
10 J/cm²	98,26 (84,13; 102,47) Aa	51,98 (40,64; 56,62) Ba
15 J/cm²	92,13 (60,47; 100,86) Aa	40,02 (38,16; 45,6) Bb

Letras diferentes demonstram diferença estatística significativa. Maiúsculas comparam tratamento clareador, e minúsculas comparam as doses de energia (Kruskal-Wallis e Dunn Test, $\alpha=0,05$)

Análise da atividade da fosfatase alcalina

Para a análise da atividade de fosfatase alcalina, foram observados resultados semelhantes aos obtidos no MTT (Tabela 4). As diferentes doses de energia não foram capazes de estimular o aumento da atividade da proteína avaliada, nos grupos com e sem exposição ao agente clareador, mantendo os valores dos grupos controle (sem irradiação laser). No entanto, o clareamento dental reduziu os valores de atividade da fosfatase alcalina, em todos os grupos expostos a este agente (Kruskal-Wallis e Dunn Test, $p<0,05$).

Tabela 4 - Medianas (mínimo; máximo) da atividade da fosfatase alcalina (absorbância, nm – U/L) de acordo com os grupos experimentais e controle.

Irradiação Laser	Clareamento	
	Ausente	PH 35%
0	0,85 (0,77; 1,04) Aa	0,60 (0,5; 0,72) Ba
4 J/cm2	0,84 (0,72; 1,09) Aa	0,61 (0,55; 0,83) Ba
10 J/cm2	0,89 (0,73; 1,07) Aa	0,61 (0,47; 0,68) Ba
15 J/cm2	0,86 (0,56; 1,07) Aa	0,61 (0,46; 0,67) Ba

Letras diferentes demonstram diferença estatística significativa. Maiúsculas comparam tratamento clareador, e minúsculas comparam as doses de energia (Kruskal-Wallis e Dunn Test, $\alpha=0,05$).

Expressão gênica de proteínas dentinárias (PCR em tempo real)

Após observação dos padrões de normalidade e homocedasticidade dos dados, a expressão de fosfatase alcalina e colágeno tipo I e fibronectina (Tabelas 5, 6 e 7) por PCR em tempo real foram analisadas através da Análise de variância a dois critérios (ANOVA two-way) e teste de Tukey ($\alpha=0,05$). Não foi observada interação entre os fatores para a fosfatase alcalina e colágeno tipo I, sendo apenas o fator “clareamento” estatisticamente significativo (Tabela 5 e 6; $p<0,001$). Observou-se redução dos valores obtidos nos grupos clareados para estes dois genes (ALP e COL-I), diferindo estatisticamente dos grupos sem exposição ao agente clareador (Teste de Tukey, $p<0,05$). Apesar da redução da expressão gênica de ALP e COL-I nos grupos clareados, o laser não causou nenhuma modulação na resposta celular referente a estes genes, mantendo os valores semelhantes aos grupos controle relativos à aplicação ou não do agente clareador (Teste de Tukey, $p>0,05$).

Tabela 5 - Médias (desvio-padrão) da expressão gênica de ALP de acordo com os grupos experimentais e controle.

Irradiação Laser	Clareamento	
	Ausente	PH 35%
0	1,00 (0,07)	0,49 (0,14)
4 J/cm²	1,20 (0,14)	0,38 (0,1)
10 J/cm²	1,07 (0,14)	0,48 (0,14)
15 J/cm²	1,00 (0,13)	0,44 (0,12)
	A	B

Letras diferentes demonstram diferença estatística significativa (Teste de Tukey, $\alpha=0,05$).

Tabela 6 - Médias (desvio-padrão) da expressão gênica de COL-I de acordo com os grupos experimentais e controle.

Irradiação Laser	Clareamento	
	Ausente	PH 35%
0	1,00 (0,14)	0,45 (0,15)
4 J/cm²	1,22 (0,22)	0,45 (0,14)
10 J/cm²	1,05 (0,17)	0,42 (0,15)
15 J/cm²	0,96 (0,15)	0,51 (0,19)
	A	B

Letras diferentes demonstram diferença estatística significativa (Teste de Tukey, $\alpha=0,05$).

A análise da expressão de fibronectina demonstrou interação estatisticamente significativa entre os fatores (irradiação laser x clareamento) (Tabela 7; $p=0,0034$). Foi observada influência negativa do clareamento para este gene, de modo semelhante ao ocorrido nas demais avaliações. Todavia, a irradiação laser nas três doses de energia propostas (4, 10 e 15 J/cm²) acarretaram uma redução na expressão deste gene, fazendo com que os valores de expressão de fibronectina nos grupos sem clareamento (G3, G4 e G5) fossem estatisticamente semelhantes aos grupos expostos ao agente clareador (G6, G7 e G8).

Tabela 7 - Médias (desvio-padrão) da expressão gênica de FN de acordo com os grupos experimentais e controle.

Irradiação Laser	Clareamento	
	Ausente	PH 35%
0	1,00 (0,08) Aa	0,45 (0,16) Ba
4 J/cm²	0,54 (0,09) Ab	0,32 (0,09) Ba
10 J/cm²	0,73 (0,10) Ab	0,34 (0,07) Ba
15 J/cm²	0,53 (0,12) Ab	0,27 (0,12) Ba

Letras diferentes demonstram diferença estatística significativa. Maiúsculas comparam tratamento clareador, e minúsculas comparam as doses de energia (Teste de Tukey, $\alpha=0,05$)

Discussão

O clareamento dental, tratamento estético amplamente realizado nos consultórios odontológicos, tem sido extensamente avaliado [3, 4, 7, 21-25], quanto à existência de diversos efeitos colaterais, que têm tornando a afirmação “tratamento seguro e não invasivo”, anteriormente utilizados como descritores deste procedimento, sujeito à dúvidas [26]. Um dos aspectos abordados nos recentes estudos são os efeitos do clareamento sobre as células e tecido pulpare [1-4, 7, 27]. O clareamento pode causar extensos danos às células pulpares, mesmo utilizando agentes de baixa como alta concentração, conforme demonstrado por diversos estudos prévios [2, 4, 5]. Estes resultados corroboram com os achados do presente estudo, que demonstrou efeitos deletérios do clareamento no metabolismo celular de células odontoblastóides, assim como causou redução da atividade de ALP e expressão gênica de ALP, FN e COL-I.

Os danos celulares decorrentes da aplicação de agentes clareadores são causados pela reação entre as EROs liberadas pelo agente clareador e difundidas pela estrutura dental, que reagem com os ácidos graxos insaturados da membrana plasmática, quebrando estas ligações [28, 29], podendo causar desde o aumento da permeabilidade da membrana, ativação de endonucleases e proteases, e até morte celular [30].

Em relação à ALP, as EROs difundidas pelo esmalte e dentina podem ter causado a redução da atividade desta enzima devido à interação dos radicais livres

formados e a cadeia protéica, acarretando a quebra da sequência de aminoácidos constituintes próximo ao centro ativo da molécula, acarretando a fragmentação da proteína [31] Observando-se a significativa redução no metabolismo celular, avaliado pelo teste de MTT, a agressão causada pelas EROs pode ter reduzido a atividade celular, influenciando negativamente a expressão gênica, indicando que diversas funções celulares podem ser prejudicadas pela exposição aos subprodutos do tratamento clareador.

Sendo assim, alternativas devem ser avaliadas para a redução da extensão dos efeitos deletérios do clareamento sobre as células pulpares, e a utilização do laser de baixa potência é uma delas. De acordo com estudos prévios, esta terapia tem demonstrado resultados interessantes quanto à diferenciação celular e reparo tecidual [32-35], podendo ser utilizado como terapia coadjuvante na modulação da resposta pulpar após o clareamento. Uma das vias de ação do laser nas células inicia-se na mitocôndria, acarretando aumento dos níveis de ATP e do cálcio intracelular [36]. Outra via é através da ativação da citocromo-c oxidase, com a dissociação do óxido nítrico do centro catalítico desta enzima [37].

Um estudo anterior demonstrou que a irradiação laser possibilitou um aumento na viabilidade celular de fibroblastos, após a exposição destes aos agentes clareadores [12]. Em relação às células odontoblastóides utilizadas também no presente estudo, a laserterapia, nos parâmetros selecionados, foi capaz de aumentar a atividade da fosfatase alcalina após a realização de três sessões, no entanto, não houve alteração no metabolismo das células avaliadas (Lima et al. resultados não publicados).

Assim como em estudo anterior (Lima et al. dados não publicados), o metabolismo celular não foi alterado após a irradiação laser no presente trabalho, para nenhuma das doses avaliadas, com exceção das células expostas ao agente clareador que foram irradiadas por 15 J/cm^2 . Estas células tiveram seu metabolismo reduzido em relação ao grupo controle positivo, fato que pode ser explicado pelo fenômeno denominado “dose resposta bifásico” ou “hormesis”. Segundo ele, baixas doses de energia podem causar efeitos positivos ao metabolismo celular, enquanto o aumento destas doses pode reduzir estes efeitos benéficos, ou até mesmo causar danos à atividade celular. Os efeitos negativos não foram observados nas células não expostas ao agente clareador possivelmente por estas não terem sofrido nenhum tipo de agressão prévia, o que reduziu a susceptibilidade destas células aos efeitos negativos da irradiação laser com a dose de 15 J/cm^2 .

Os protocolos de irradiação laser avaliados não foram capazes de aumentar a atividade da fosfatase alcalina produzida pelos odontoblastos, diferindo dos dados obtidos em estudos prévios (Lima et al. resultados não publicados). Estes resultados podem ser explicados pela diferença de protocolos entre os dois experimentos. No estudo anterior, apesar da utilização do mesmo dispositivo de irradiação, foram utilizados diferentes parâmetros (potência=40mW) (Lima et al. dados não publicados). Além disso o número de irradiações também foi diferente do utilizado no presente estudo. Sabe-se que alterações de qualquer parâmetro utilizado para a laserterapia, como tipo celular, potência, número de irradiações, área irradiada, dose de energia e comprimento de onda da luz utilizada,

podem alterar a resposta obtida [38], sendo esta a provável causa dos diferentes resultados entre os estudos.

Além do metabolismo celular e da atividade da fosfatase alcalina, foram avaliadas a expressão gênica de proteínas associadas à formação e mineralização dentinárias, como colágeno tipo I, fosfatase alcalina e fibronectina. O objetivo desta análise foi verificar se a laserterapia poderia alterar a expressão destes genes, indicando uma possível resposta das células odontoblásticas frente a agressão causada pelos subprodutos clareadores difundidos pela estrutura dental. Os protocolos de irradiação avaliados não foram capazes de alterar o metabolismo celular, atividade de ALP e expressão gênica. Porém, a fibronectina, apresentou redução em sua expressão nas células sem exposição ao agente clareador, igualando os resultados àqueles obtidos após realização do tratamento. A fibronectina é uma proteína relacionada com o processo de adesão, migração, proliferação e diferenciação celular [39]. Além disso, a presença desta proteína está relacionada com a mineralização dos tecidos, e formação de tecido dentinário [40, 41].

Diante dos resultados obtidos, com a redução na expressão de fibronectina e inalteração da expressão de COL-I e ALP, pode-se especular que apenas uma sessão de irradiação laser nos parâmetros avaliados não acarretaria na indução de qualquer processo de mineralização com consequente formação de dentina reacional em dentes submetidos ou não ao tratamento clareador, indicando que este protocolo se torna ineficaz para a biomodulação da resposta pulpar quando estes fatores são considerados.

No entanto, a laserterapia apresenta-se importante na redução da inflamação e reparo tecidual frente a outras agressões [42, 43], e conforme observado em estudo prévio (Dantas et al., 2010), pode representar uma importante alternativa na terapia de modulação da resposta celular frente o tratamento clareador. No entanto, deve ser enfatizado que esta técnica deve ser precedida de outros procedimentos que impeçam que as EROs difundidas pela estrutura dental causem danos às células da polpa, de modo que a o uso do laser seja uma terapia complementar na manutenção das características de normalidade do tecido pulpar.

Conclusões

Diante dos resultados obtidos e análise estatística aplicada, pode-se concluir que:

- O tratamento clareador causou redução no metabolismo dos odontoblastos, assim como na atividade de ALP e expressão de Col-I, ALP e FN.;
- A laserterapia, segundo os parâmetros avaliados, não exerceu influência no metabolismo das células MDPC-23, assim como na atividade de ALP e expressão gênica de ALP e COL-I;
- A irradiação laser reduziu a expressão gênica de fibronectina pelos odontoblastos não expostos aos agentes clareadores, em todas as doses de energia avaliadas.

Referências

1. Costa CA, Riehl H, Kina JF, Sacono NT, Hebling J. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. **109**, e59 (2010).
2. Dias Ribeiro AP, Sacono NT, Lessa FC, Nogueira I, Coldebella CR, Hebling J, et al. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. **108**, 458 (2009).
3. Lima AF, Lessa FC, Hebling J, de Souza Costa CA, Marchi GM. Eur J Dent. **4**, 238 (2010).
4. Lima AF, Lessa FC, Mancini MN, Hebling J, Costa CA, Marchi GM. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. **109**, e70 (2010).
5. Soares DG, Ribeiro AP, Sacono NT, Coldebella CR, Hebling J, Costa CA. Int Endod J. **44**, 116 (2011).
6. Trindade FZ, Ribeiro AP, Sacono NT, Oliveira CF, Lessa FC, Hebling J, et al. Int Endod J. **42**, 516 (2009).
7. de Lima AF, Lessa FC, Gasparoto Mancini MN, Hebling J, de Souza Costa CA, Marchi GM. J Biomed Mater Res B Appl Biomater. **90**, 907 (2009).
8. Kawamoto K, Tsujimoto Y. J Endod. **30**, 45 (2004).
9. Gokay O, Mujdeci A, Algin E. Int Endod J. **38**, 516 (2005).
10. Gokay O, Mujdeci A, Algin E. J Endod. **30**, 887 (2004).
11. Asfora KK, Santos Mdo C, Montes MA, de Castro CM. J Dent. **33**, 155 (2005).
12. Dantas CM, Vivan CL, Ferreira LS, Freitas PM, Marques MM. Braz Oral Res. **24**, 460 (2010).
13. Hanks CT, Fat JC, Wataha JC, Corcoran JF. J Dent Res. **72**, 931 (1993).
14. Robertson WD, Melfi RC. J Endod. **6**, 645 (1980).
15. Kossatz S, Dalanhol AP, Cunha T, Loguercio A, Reis A. Oper Dent. **36**, 251 (2011).
16. Reis A, Tay LY, Herrera DR, Kossatz S, Loguercio AD. Oper Dent. **36**, 590 (2011).
17. Chandler NP. N Z Dent J. **85**, 23 (1989).
18. Jacques P, Hebling J. Dent Mater. **21**, 103 (2005).
19. Oliveira CF, Basso FG, Lins EC, Kurachi C, Hebling J, Bagnato VS, et al. Laser Phys Lett. **8**, 155 (2011).
20. Roy AV. Clin Chem. **16**, 431 (1970).
21. da Silva AP, Lima AF, Cavalcanti AN, Marchi GM. Gen Dent. **58**, e174 (2010).
22. Lima AF, Fonseca FM, Cavalcanti AN, Aguiar FH, Marchi GM. Am J Dent. **23**, 113 (2010).

23. Lima AF, Fonseca FM, Freitas MS, Palialol AR, Aguiar FH, Marchi GM. J Adhes Dent. (2010).
24. Rodrigues JA, Marchi GM, Ambrosano GM, Heymann HO, Pimenta LA. Dent Mater. **21**, 1059 (2005).
25. Faraoni-Romano JJ, Turssi CP, Serra MC. Am J Dent. **20**, 31 (2007).
26. Nour El-din AK, Miller BH, Griggs JA, Wakefield C. Oper Dent. **31**, 106 (2006).
27. Kina JF, Huck C, Riehl H, Martinez TC, Sacono NT, Ribeiro AP, et al. Int Endod J. **43**, 572 (2010).
28. Halliwell B. Plant Physiol. **141**, 312 (2006).
29. Halliwell B, Gutteridge JM. Lancet. **2**, 1095 (1984).
30. Bellomo G, Mirabelli F. Mol Toxicol. **1**, 281 (1987).
31. Koyama I, Yakushijin M, Goseki M, Iimura T, Sato T, Sonoda M, et al. Clin Chim Acta. **275**, 27 (1998).
32. Freire MRS, Almeida D, Santos JN, Sarmento VA. Laser Phys. **21**, 958 (2011).
33. Queiroga AS, Sousa FB, Araujo JMS, Santos SD, Sousa CDS, Quintans TC, et al. Laser Phys. **18**, 1087 (2008).
34. Ribeiro APD, Pavarina AC, Trindade FZ, Bagnato VS, Kurachi C, Costa CAD. Laser Phys. **21**, 229 (2011).
35. Oliveira CF, Basso FG, Lins EC, Kurachi C, Hebling J, Bagnato VS, et al. Laser Phys. **20**, 1659 (2010).
36. Karu TI, Pyatibrat LV, Afanasyeva NI. Photochem Photobiol. **80**, 366 (2004).
37. Sarti P, Arese M, Bacchi A, Barone MC, Forte E, Mastronicola D, et al. IUBMB Life. **55**, 605 (2003).
38. Moore P, Ridgway TD, Higbee RG, Howard EW, Lucroy MD. Lasers Surg Med. **36**, 8 (2005).
39. Nakashima M. Cytokine Growth Factor Rev. **16**, 369 (2005).
40. Tziafas D, Panagiotakopoulos N, Komnenou A. Arch Oral Biol. **40**, 23 (1995).
41. Tziafas D, Alvanou A, Kaidoglou K. J Dent Res. **71**, 1189 (1992).
42. Sivieri-Araujo G, Berbert FLCV, Ramalho LTO, Rastelli ANS, Crisci FS, Bonetti I, et al. Laser Phys. **21**, 2149 (2011).
43. Bastos JLN, Lizarelli RFZ, Parizotto NA. Laser Phys. **19**, 1925 (2009).

CONSIDERAÇÕES GERAIS

Apesar da facilidade de realização, o tratamento clareador é um procedimento clínico complexo, em relação aos seus possíveis efeitos colaterais. A não observância de detalhes inerentes à técnica pode levar o clínico à realização de restaurações pós clareamento que podem ter seu sucesso comprometido, uma vez que a união à superfície clareada é prejudicada pelo montante de EROs que mantêm-se nesta região, após o término do procedimento clareador (Basting *et al.*, 2004; da Silva *et al.*, 2010; Lima *et al.*, 2010a). Além deste fato, o tratamento clareador pode causar redução do conteúdo mineral do esmalte dental (Paula Sde *et al.*, 2010; Cavalli *et al.*, 2011), com consequente redução da microdureza desta superfície (Basting *et al.*, 2003; Faraoni-Romano *et al.*, 2007; Soldani *et al.*, 2010).

Outro fator a ser considerado no momento são os efeitos deletérios deste procedimento sobre as células pulpares, conforme demonstrado em diversos estudos (de Lima *et al.*, 2009; Dias Ribeiro *et al.*, 2009; Lima *et al.*, 2010b; Lima *et al.*, 2010c; Soares *et al.*, 2011). Clinicamente, estes aspectos podem ser notados diante dos relatos de hipersensibilidade após a realização do procedimento clareador, sendo este sintoma mais exacerbado quando o tratamento é realizado utilizando agentes de alta concentração (Amengual *et al.*, 2009). Histologicamente, o procedimento clareador pode causar desde uma leve inflamação (Robertson *et al.*, 1980), até a necrose parcial do tecido presente na câmara pulpar, em incisivos humanos (Costa *et al.*, 2010). A resposta celular e tecidual pode ser de maior ou menor intensidade, de acordo com a concentração do agente clareador (de Lima *et al.*, 2009; Lima *et al.*, 2010c; Soares *et al.*, 2011) e espessura dentinária presente (Costa *et al.*, 2010; Kina *et al.*, 2010).

Assim, diante dos trabalhos previamente publicados, o uso do peróxido de carbamida 10% poderia ser a melhor opção para a realização do procedimento clareador,

uma vez que este não demonstrava nenhum efeito deletério às células odontoblastóides após a difusão pelo esmalte e dentina (Lima *et al.*, 2010c; Soares *et al.*, 2011).

Pôde-se observar por meio dos resultados obtidos que a o uso diário do gel clareador à base de peróxido de carbamida 10% pode causar efeitos deletérios às células pulpares. Apesar de uma aplicação deste agente não ter promovido danos significativos às células odontoblastóides, dados corroborados por estudos anteriores (Lima *et al.*, 2010c; Soares *et al.*, 2011), a aplicação consecutiva causou um expressivo aumento na toxicidade deste agente, provavelmente pela reduzida capacidade de reação das células frente a esta agressão diária. Estes dados são importantes pois demonstram que a aplicação sucessiva de agentes clareadores, mesmo em reduzidas concentrações, pode ocasionar danos significativos às células pulpares, indicando que uma alteração no protocolo, como a aplicação dos gel em dias intercalados, poderia resultar em redução dos efeitos colaterais à polpa dental, causados pelo procedimento clareador. No entanto, para que a alteração do protocolo ocorra, mais estudos devem ser realizados avaliando a viabilidade do novo procedimento, para que este seja apoiado em evidências científicas, comprovando sua eficácia e segurança.

Diante dos diversos dados presentes na literatura sobre a citotoxicidade do clareamento (de Lima *et al.*, 2009; Dias Ribeiro *et al.*, 2009; Trindade *et al.*, 2009), Lima et al. (2010 a,b) sugeriram o uso e demonstraram a efetividade do ascorbato de sódio na redução dos efeitos deletérios causados pelos agentes clareadores sobre as células odontoblásticas. No entanto, os dados apresentados por estes autores foram obtidos através de testes *in vitro*, o que limita a indicação deste agente na redução dos efeitos deletérios dos agentes clareadores sobre o tecido pulpar.

Diante disso, foi avaliado se a ingestão de ácido ascórbico (ascorbato na forma ionizada), poderia reduzir os efeitos deletérios dos agentes clareadores sobre a polpa dental de ratos Wistar. Os dados apresentados demonstraram que a terapia utilizando o ácido ascórbico não foi capaz de reduzir expressivamente os danos causados pelo

clareamento, mas demonstrou uma modulação positiva na capacidade de recuperação do tecido pulpar dos ratos diante do procedimento realizado. Dois motivos podem ser destacados para a não influência do tratamento clareador sobre a polpa dental. Um deles é que o agente clareador, devido à alta concentração, causou uma ampla taxa de difusão de peróxido de hidrogênio ou produtos de sua degradação (tais como os radicais hidroxila ($\text{OH}^\cdot$) em direção à polpa, acarretando um efeito deletério tão acentuado que impossibilitou a eficiente ação dos agentes antioxidantes na redução dos danos teciduais.

Outra explicação para os resultados obtidos é a que a administração oral do ácido ascórbico não foi capaz de aumentar significativamente o nível de antioxidantes no tecido pulpar e, conseqüentemente, não promoveu melhora na resposta tecidual diante da agressão causada pelo procedimento clareador, resultando em efeitos similares nos grupos com e sem administração do agente antioxidante. No entanto, a menor desorganização tecidual após 6 e 24h do tratamento nos dentes dos animais que tiveram administração prévia do AA, torna a primeira hipótese, de que a maior disponibilidade das EROs e a exacerbada toxicidade do tratamento impossibilitou os efeitos positivos da administração do ácido ascórbico, como a mais provável.

Neste sentido, o uso do ácido ascórbico para redução dos danos pulpares causados pelo clareamento ainda está sobre investigação, uma vez que o efeito deste agente deve ser avaliado em situações em que ocorra uma resposta inflamatória moderada, podendo assim, reduzir os efeitos deletérios causados pelo tratamento clareador, auxiliando na obtenção de um procedimento mais seguro ao tecido pulpar.

Ainda na tentativa de modulação da resposta celular perante o clareamento, a laserterapia foi avaliada, com o intuito de verificar se a resposta celular seria alterada de modo positivo, mesmo após de realizada a agressão pelo uso dos agentes clareadores. Dois protocolos foram avaliados, fixando entre eles a dose de energia utilizada, variando principalmente, o número de sessões desta terapia alternativa. De acordo com os dados obtidos, verificou-se que uma sessão de irradiação laser (InGaAsP – 780 nm) foi ineficaz na

modulação da resposta celular frente aos agentes clareadores. No entanto, quando a realização de três sessões foi avaliada, houve um aumento na atividade da fosfatase alcalina, indicando uma resposta celular frente a agressão, quando a dose de energia de $4\text{J}/\text{cm}^2$ foi aplicada. Diante dos resultados, pode-se especular que seja necessária não só a dose de energia adequada, mas também uma periodicidade na realização das irradiações, para que haja uma modulação na resposta celular de forma mais efetiva.

Este fato, apesar de interessante, torna o uso da laserterapia questionável em algumas situações, uma vez que faz-se necessário a realização de diversas sessões clínicas para obtenção de êxito, dificultando a adesão ao tratamento por parte do paciente e aumentando consideravelmente o custo do procedimento.

A facilidade de execução do tratamento clareador, aliada à sua efetividade e estabilidade não devem ser esquecidas ou ignoradas. Todavia, seus efeitos deletérios em relação ao tecido pulpar devem ser considerados, uma vez que estes podem acarretar em alguns casos, mesmo que de forma silenciosa, alterações definitivas e importantes na polpa dental. Sendo assim, este estudo teve por objetivo a busca e análise de alternativas para a redução dos efeitos tóxicos dos agentes clareadores sobre as células pulpares, obtendo resultados iniciais que podem ser importantes para servir como guia para novos estudos. Alterações dos parâmetros e aplicações dos protocolos propostos, assim como novas alternativas de tratamento devem ser testadas, para que o procedimento clareador torne-se, realmente, um procedimento seguro e não invasivo.

CONCLUSÃO

De acordo com as condições experimentais e com base nos resultados obtidos foi possível concluir que:

- Uma simples aplicação do gel à base de peróxido de carbamida 10% não causa efeitos deletérios às células odontoblastóides, no entanto, aplicações consecutivas deste gel causam severos danos às células pulpares;
- A realização do tratamento clareador com um agente de alta concentração (PH 35%) por um período de 10 min causou extenso dano à polpa dental de ratos Wistar, com áreas de necrose da câmara pulpar dos dentes tratados;
- O uso do ácido ascórbico previamente à aplicação do peróxido de hidrogênio 35% por 10 minutos não foi capaz de reduzir significativamente os danos causados pelo procedimento clareador;
- a concentração de 0,01% de peróxido de carbamida causou efeitos tóxicos para as células odontoblastóides MDPC-23, como redução de metabolismo e de atividade da fosfatase alcalina.
- Três aplicações do laser de baixa potencia nas diferentes doses de energia testadas (4; 10; 15J/cm²) não foi capaz de modular o metabolismo das células MDPC-23 previamente agredidas por componentes do gel clareador avaliado;
- Três aplicações do laser de baixa potência na dose de energia de 4J/cm² resultou em aumento da atividade de fosfatase alcalina, tanto nos grupos

expostos ao agente clareador, como nos grupos submetidos apenas a irradiação.

- Os sub-produtos do tratamento clareador com peróxido de hidrogênio 35% difundidos pelo disco de esmalte-dentina causaram redução no metabolismo dos odontoblastos, assim como na atividade de ALP e expressão de Col-I, ALP e FN.;
- Uma aplicação do laser (InGaAsP – 780 nm), nas três doses de energia avaliadas (4, 10 e 15 J/cm²), não exerceu influência no metabolismo das células MDPC-23, assim como na atividade de ALP e expressão de ALP e COL-I;
- A irradiação laser (InGaAsP – 780 nm) reduziu a expressão de fibronectina pelos odontoblastos não expostos aos agentes clareadores, em todas as doses de energia avaliadas.

REFERÊNCIAS *

Amengual J, Forner L. Dentine hypersensitivity in dental bleaching: case report. *Minerva Stomatol.* 2009; 58(4): 181-5.

Basting RT, Rodrigues AL, Jr., Serra MC. The effects of seven carbamide peroxide bleaching agents on enamel microhardness over time. *J Am Dent Assoc.* 2003; 134(10): 1335-42.

Basting RT, Rodrigues JA, Serra MC, Pimenta LA. Shear bond strength of enamel treated with seven carbamide peroxide bleaching agents. *J Esthet Restor Dent.* 2004; 16(4): 250-9; discussion 259-60.

Cavalli V, Rodrigues LK, Paes-Leme AF, Soares LE, Martin AA, Berger SB, *et al.* Effects of the addition of fluoride and calcium to low-concentrated carbamide peroxide agents on the enamel surface and subsurface. *Photomed Laser Surg.* 2011; 29(5): 319-25.

Coldebella CR, Ribeiro AP, Sacono NT, Trindade FZ, Hebling J, Costa CA. Indirect cytotoxicity of a 35% hydrogen peroxide bleaching gel on cultured odontoblast-like cells. *Braz Dent J.* 2009; 20(4): 267-74.

Costa CA, Riehl H, Kina JF, Sacono NT, Hebling J. Human pulp responses to in-office tooth bleaching. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2010; 109(4): e59-64.

da Silva AP, Lima AF, Cavalcanti AN, Marchi GM. Effects of 3% sodium ascorbyl phosphate on the hardness and bond strength of human enamel bleached with 10% carbamide peroxide. *Gen Dent.* 2010; 58(4): e174-8.

de Lima AF, Lessa FC, Gasparoto Mancini MN, Hebling J, de Souza Costa CA, Marchi GM. Cytotoxic effects of different concentrations of a carbamide peroxide bleaching gel on odontoblast-like cells MDPC-23. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2009; 90(2): 907-12.

Dias Ribeiro AP, Sacono NT, Lessa FC, Nogueira I, Coldebella CR, Hebling J, *et al.* Cytotoxic effect of a 35% hydrogen peroxide bleaching gel on odontoblast-like MDPC-23 cells. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2009; 108(3): 458-64.

* De acordo com a Norma da UNICAMP/FOP, baseada na Norma do International Committee of Medical Journal Editors – Grupo de Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline

Ekuni D, Tomofuji T, Sanbe T, Irie K, Azuma T, Maruyama T, *et al.* Vitamin C intake attenuates the degree of experimental atherosclerosis induced by periodontitis in the rat by decreasing oxidative stress. *Arch Oral Biol.* 2009; 54(5): 495-502.

Faraoni-Romano JJ, Turssi CP, Serra MC. Concentration-dependent effect of bleaching agents on microhardness and roughness of enamel and dentin. *Am J Dent.* 2007; 20(1): 31-4.

Ferreira AN, Silveira L, Genovese WJ, de Araujo VC, Frigo L, de Mesquita RA, *et al.* Effect of GaAIs laser on reactional dentinogenesis induction in human teeth. *Photomed Laser Surg.* 2006; 24(3): 358-65.

Frei B, Stocker R, Ames BN. Antioxidant defenses and lipid peroxidation in human blood plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988; 85(24): 9748-52.

Hanks CT, Fat JC, Wataha JC, Corcoran JF. Cytotoxicity and dentin permeability of carbamide peroxide and hydrogen peroxide vital bleaching materials, in vitro. *J Dent Res.* 1993; 72(5): 931-8.

Karu TI, Pyatibrat LV, Kalendo GS, Esenaliev RO. Effects of monochromatic low-intensity light and laser irradiation on adhesion of HeLa cells in vitro. *Lasers Surg Med.* 1996; 18(2): 171-7.

Karu TI, Pyatibrat LV, Afanasyeva NI. A novel mitochondrial signaling pathway activated by visible-to-near infrared radiation. *Photochem Photobiol.* 2004; 80(2): 366-72.

Khadra M, Lyngstadaas SP, Haanaes HR, Mustafa K. Effect of laser therapy on attachment, proliferation and differentiation of human osteoblast-like cells cultured on titanium implant material. *Biomaterials.* 2005; 26(17): 3503-9.

Kina JF, Huck C, Riehl H, Martinez TC, Sacono NT, Ribeiro AP, *et al.* Response of human pulps after professionally applied vital tooth bleaching. *Int Endod J.* 2010; 43(7): 572-80.

Lima AF, Fonseca FM, Freitas MS, Palialol AR, Aguiar FH, Marchi GM. Effect of Bleaching Treatment and Reduced Application Time of an Antioxidant on Bond Strength to Bleached Enamel and Subjacent Dentin. *J Adhes Dent.* 2010a.

Lima AF, Lessa FC, Hebling J, de Souza Costa CA, Marchi GM. Protective Effect of Sodium Ascorbate on MDPC-23 Odontoblast-Like Cells Exposed to a Bleaching Agent. *Eur J Dent.* 2010b; 4(3): 238-44.

Lima AF, Lessa FC, Mancini MN, Hebling J, Costa CA, Marchi GM. Transdental protective role of sodium ascorbate against the cytopathic effects of H₂O₂ released from bleaching agents. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2010c; 109(4): e70-6.

Nandi D, Patra RC, Swarup D. Effect of cysteine, methionine, ascorbic acid and thiamine on arsenic-induced oxidative stress and biochemical alterations in rats. *Toxicology*. 2005; 211(1-2): 26-35.

Nour El-din AK, Miller BH, Griggs JA, Wakefield C. Immediate bonding to bleached enamel. *Oper Dent*. 2006; 31(1): 106-14.

Patra RC, Swarup D, Dwivedi SK. Antioxidant effects of alpha tocopherol, ascorbic acid and L-methionine on lead induced oxidative stress to the liver, kidney and brain in rats. *Toxicology*. 2001; 162(2): 81-8.

Paula Sde S, Soares LE, do Espirito Santo AM, Martin AA, Cavalli V, Liporoni PC. FT-Raman and energy dispersive X-ray fluorescence spectrometric analyses of enamel submitted to 38% hydrogen peroxide bleaching, an acidic beverage, and simulated brushing. *Photomed Laser Surg*. 2010; 28(3): 391-6.

Robertson WD, Melfi RC. Pulpal response to vital bleaching procedures. *J Endod*. 1980; 6(7): 645-9.

Rodrigues JA, Marchi GM, Ambrosano GM, Heymann HO, Pimenta LA. Microhardness evaluation of in situ vital bleaching on human dental enamel using a novel study design. *Dent Mater*. 2005; 21(11): 1059-67.

Romanos GE, Pelekanos S, Strub JR. Effects of Nd:YAG laser on wound healing processes: clinical and immunohistochemical findings in rat skin. *Lasers Surg Med*. 1995; 16(4): 368-79.

Soares DG, Ribeiro AP, Sacono NT, Coldebella CR, Hebling J, Costa CA. Transenamel and transdental cytotoxicity of carbamide peroxide bleaching gels on odontoblast-like MDPC-23 cells. *Int Endod J*. 2011; 44(2): 116-25.

Soldani P, Amaral CM, Rodrigues JA. Microhardness evaluation of in situ vital bleaching and thickening agents on human dental enamel. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 2010; 30(2): 203-11.

Tomofuji T, Ekuni D, Sanbe T, Irie K, Azuma T, Maruyama T, *et al*. Effects of vitamin C intake on gingival oxidative stress in rat periodontitis. *Free Radic Biol Med*. 2009; 46(2): 163-8.

Trindade FZ, Ribeiro AP, Sacono NT, Oliveira CF, Lessa FC, Hebling J, *et al*. Trans-enamel and trans-dental cytotoxic effects of a 35% H₂O₂ bleaching gel on cultured odontoblast cell lines after consecutive applications. *Int Endod J*. 2009; 42(6): 516-24.

Zantner C, Beheim-Schwarzbach N, Neumann K, Kielbassa AM. Surface microhardness of enamel after different home bleaching procedures. *Dent Mater*. 2007; 23(2): 243-50.

ANEXO 1

Comprovante de submissão do Artigo Referente ao Capítulo 1

ScholarOne Manuscripts

<http://mc.manuscriptcentral.com/jor>



[Edit Account](#) | [Instructions & Forms](#) | [Log Out](#) | [Get Help Now](#)

SCHOLARONE™
Manuscripts

[Main Menu](#) → [Author Dashboard](#) → Submission Confirmation

You are logged in as Adriano Lima

Submission Confirmation

Thank you for submitting your manuscript to *Journal of Oral Rehabilitation*.

Manuscript ID: JOR-12-0087

Title: Toxic effects of daily applications of 10% carbamide peroxide on odontoblast-like MDPC-23 cells

Date Submitted: 21-Feb-2012

 Print  Return to Dashboard

ScholarOne Manuscripts™ v4.8.1 (patent #7,257,767 and #7,263,655). © ScholarOne, Inc., 2012. All Rights Reserved.
ScholarOne Manuscripts is a trademark of ScholarOne, Inc. ScholarOne is a registered trademark of ScholarOne, Inc.

 Follow ScholarOne on Twitter

[Terms and Conditions of Use](#) - [ScholarOne Privacy Policy](#) - [Get Help Now](#)

ANEXO 2

Certificado de Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa Animal



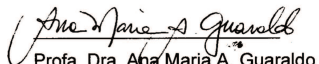
Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/Unicamp

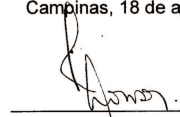
CERTIFICADO

Certificamos que o projeto "Efeito da administração de ácido ascórbico previamente ao tratamento clareador na resposta inflamatória da polpa dental de ratos Wistar" (protocolo nº 2515-1), sob a responsabilidade de Profa. Dra. Giselle Maria Marchi / Adriano Fonseca de Lima, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL) e com a legislação vigente, LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e o DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP - em 18 de agosto de 2011.

Campinas, 18 de agosto de 2011.


Profa. Dra. Ana Maria A. Guarnaldo
Presidente


Fátima Alonso
Secretária Executiva

CEUA/UNICAMP
Caixa Postal 6109
13083-970 Campinas, SP – Brasil

Telefone: (19) 3521-6359
E-mail: comisib@unicamp.br
<http://www.ib.unicamp.br/ceea/>