TALITA CHISTINE CAMILO LOPEZ

Investigação dos efeitos de substâncias liberadas por materiais utilizados no tratamento da Hipersensibilidade Dentinária (Gluma e Biovidro), associados ou não à laser fototerapia, na proliferação e diferenciação de células mesenquimais de polpa dentária humana

São Paulo

2013

TALITA CHRISTINE CAMILO LOPEZ

Investigação dos efeitos de substâncias liberadas por materiais utilizados no tratamento da Hipersensibilidade Dentinária (Gluma e Biovidro), associados ou não à laser fototerapia, na proliferação e diferenciação de células mesenquimais de polpa dentária humana

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, para obter o título de Mestre, pelo programa de Pós-Graduação em Odontologia.

Área de Concentração: Dentística

Orientador: Profa. Dra. Márcia Martins Marques

São Paulo

2013

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo-na-Publicação
Serviço de Documentação Odontológica
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Lopez, Talita Christine Camilo.

Investigação dos efeitos de substâncias liberadas por materiais utilizados no tratamento da Hipersensibilidade Dentinária (Gluma e Biovidro), associados ou não à laser fototerapia, na proliferação e diferenciação de células mesenquimais de polpa dentária humana / Talita Christine Camilo Lopez ; orientador Márcia Martins Marques. -- São Paulo, 2013.

105 p. : fig., tab., graf.; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) -- Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Área de Concentração: Dentística. -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Versão corrigida

1. Sensibilidade da dentina. 2. Laser não cirúrgico. 3. Agentes dessensibilizadores da dentina I. Marques, Márcia Martins. II. Título.

Lopez TCC. Investigação dos efeitos de substâncias liberadas por materiais utilizados no tratamento da Hipersensibilidade Dentinária (Gluma e Biovidro), associados ou não à laser fototerapia, na proliferação e diferenciação de células mesenquimais de polpa dentária humana. Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, para obter o título de Mestre, pelo programa de Pós-Graduação em Odontologia.

Aprovado em: / /2013

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

*À minha mãe, Heloisa Helena Camilo da Silva e à Maria dos Santos da Silva, minha querida
“vó Helena” que se encontra no mais alto plano espiritual.*

Agradeço, em primeiro lugar, a Deus, por permitir que eu busque a evolução todos os dias da minha vida. E que com sua infinita bondade me presenteia com a trajetória sempre sonhada, primeiro a graduação e agora o Mestrado. Além da família e amigos que colocou no meu caminho, que são o meu tudo.

Ao meu Anjo da Guarda, que sempre esteve ao meu lado, principalmente nos momentos de dúvidas, dificuldades e inseguranças.

A minha Mãe, obrigada por existir e ter me dado a oportunidade de ser sua filha!!! De aprender a cada dia com você!!! Por me mostrar e me ensinar tudo o que acredito ser o certo sobre a vida. Por não medir esforços para me ajudar a conquistar meus sonhos e objetivos. Por falar de mim e das minhas conquistas com tanto orgulho. Por ter dedicado boa parte de sua vida a minha e dos meus irmãos. Por ser minha melhor amiga e a quem sempre poderei contar para tudo. Você é o meu maior exemplo de Mulher, mãe e profissional. Obrigada por ser minha Mãe! Não sei o que seria de mim sem você!! Te Amo infinitamente e além!!!!.

Ao meu pai José Abad Lopez, por sempre me oferecer amor, apoio, estrutura e ajuda sem limites.

Aos meus irmãos Isabella, Victor e Daniel, pelo amor, amizade e paciência.

A toda minha família, tios, tias, primos e primas, cunhados, e em especial meu tio Junior, que mais do que nunca tem sido um tio de ouro.

Às minhas tão amadas amigas, irmãs que escolhi Ana Paula, Carolina, Cristina, Laila e Renata.

À Cida e Neusa, sem as quais acho que seria quase impossível estar aqui hoje.

AGRADECIMENTOS

À minha querida Professora e Orientadora, **Profa. Dra. Márcia Martins Marques**, serei eternamente grata à senhora pela oportunidade que me foi dada, desde o início com a orientação da minha Iniciação Científica, e agora com o Mestrado. A senhora é e sempre será um exemplo de determinação, garra, competência, profissionalismo, ética, amor à docência e à pesquisa. Sua dedicação, ensinamentos e incentivos em sempre buscar e aprender mais e mais a cada dia jamais serão esquecidos. Deixo aqui minha eterna gratidão, respeito e admiração. Obrigada por fazer parte da minha história, profissional e pessoal, afinal a senhora é um exemplo de Mulher!!!! Muito obrigada e obrigada de novo!!!

À minha primeira orientadora, **Profa. Dra. Manoela Domingues Martins**, não tenho nem palavras para agradecer, e expressar a minha gratidão, admiração e amor por você. Lembro como se fosse hoje, durante a aula em que substituiu o Prof. Dr. Marco Antônio, onde falou com tanto entusiasmo sobre a vida acadêmica e a possibilidade de ingressar em projetos de iniciação científica, que não pensei duas vezes em procurá-la. Muito obrigada!

À minha querida amiga e praticamente co-orientadora, **Profa. Dra. Leila Soares Ferreira**, que me acompanha desde a Iniciação Científica, e por quem tenho imensa admiração. Sua contribuição na minha vida não se limitou aos ensinamentos sobre cultura celular, células-tronco e laser. Você será sempre meu anjinho guardião, tanto na vida acadêmica e profissional, como na vida pessoal.

À **Profa. Dra. Ana Cecília Aranha**, que sempre me incentivou e entendeu, desde o início, durante a entrevista de ingresso ao programa de Pós-Graduação, onde me olhou e confirmou com o olhar a minha explicação do projeto, e depois durante a orientação de créditos da Pós-Graduação. E que participou da minha banca de qualificação e que contribuiu de forma essencial para a conclusão deste trabalho. Foi e sempre será muito bom trabalhar com você.

À **Profa. Dra. Juliana Marchi e ao Roger Borges**, que contribuíram de forma essencial para que esta pesquisa se tornasse realidade, com a fabricação do Biovidro, e com todo suporte técnico a respeito destes biomateriais.

À **Profa. Dra. Maria Angela Pita Sobral**, que gentilmente aceitou contribuir para a elaboração do projeto de pesquisa que precedeu esta dissertação. Suas sugestões contribuíram de forma essencial para a concretização desta pesquisa.

À **Profa. Roberta Couto Santiago**, uma querida, um anjinho que Deus colocou no meu caminho. Muito obrigada por todas as dicas e sugestões durante o período experimental, como, por exemplo, colocar o béquer de apoio para pesar os materiais (risos). E com quem dividi meses de laboratório, sem a sua presença teria sido mais difícil esta jornada.

À **Thayse Guimarães**, por abrir tantas vezes o departamento de Materiais Dentários nos finais de semana e feriados. Por me ajudar nas interpretações dos resultados deste estudo, e a ser mais crítica. Além de ter rodado todos os testes estatísticos novamente, na procura de possíveis equívocos. E sem esquecer as fotografias tiradas com a sua super câmera (risos)!!!

À **Thais Elmadjian**, que contribuiu na realização de fotografias desta dissertação, e no levantamento de dados para esta pesquisa. E por quem tenho imensa admiração, ter você ao meu lado neste momento foi essencial. Todos os momentos de alegrias e superação vão ficar para sempre guardados na minha memória e no meu coração. Desejo que essa amizade se perdure por muitos anos.

À **Profa. Dra. Maria Fernanda Setúbal Destro Rodrigues**, que gentilmente me forneceu treinamento para o ensaio de *Western Blot*, além de me ajudar na resposta de inúmeras dúvidas durante os experimentos de cultura celular.

Ao **Prof. Dr. Nilton Azambuja**, pelos conhecimentos sobre MEV durante os créditos da Pós-Graduação, e pela motivação constante em buscar sempre mais. E por ter se tornado um grande amigo. Vamos lá time!!!

Aos alunos de graduação e Iniciação Científica, **Alice e Sairo**, por todo apoio durante a fase experimental dessa pesquisa.

À **Ivana Márcia Alves Diniz**, que gentilmente aceitou fazer os testes estatísticos desta dissertação. E por sempre me manter informada sobre os seus novos conhecimentos sobre células-tronco.

À **Profa. Dra. Sueli Patrícia Harumi Miyagi de Cara**, uma excelente professora e pesquisadora, que tive o privilégio de conviver no Laboratório de Pesquisas Básicas do Departamento de Dentística.

Aos meus amigos e companheiros de laboratório, **Renata, Cacio, Mariana, Fernando, Stella**. Muito obrigada pela atenção e apoio para a concretização desta jornada.

Aos professores da **FOUSP**, **Prof. Dr. Glauco Fioranelli Vieira**, **Profa. Dra. Adriana Bona Matos**, **Profa. Dra. Miriam Lacalle Turbino**, **Profa. Dra. Maria Aparecida Alves de Cerqueira Luz**, **Profa. Dra. Margareth Oda**, **Profa. Dra. Patricia Moreira de Freitas**, **Prof. Dr. Carlos de Paula Eduardo**, **Prof. Dr. Michel Nicolau Youssef**, **Prof. Dr. Narciso Garone Netto**, muito obrigada por todos os ensinamentos na docência e na pesquisa.

À **Profa. Vanessa Pavesi**, que fez o meu treinamento durante a Iniciação Científica na **UNINOVE**, e que muito contribuiu para a minha formação profissional.

Aos meus professores da **Universidade Nove de Julho – UNINOVE**, **Profa. Dra. Sandra Kalil Bussadori**, **Profa. Dra. Kristianne Porta Santos Fernandes**, **Prof. Dr. Marcelo Mendes**, **Prof. Ms. Jansen Osaki**, **Profa. Ms. Eliane Matsura**, **Prof. Ms. Ronaldo Pispico**, **Profa. Ms. Marcia Altavista Romão**, afinal de contas vocês contribuíram para a minha formação profissional.

Aos **colegas de Pós Graduação**, com quem dividi momentos de estudos, apresentações de aulas, e exercícios didáticos, vocês ficarão para sempre guardados na minha memória. Muito obrigada.

À técnica do laboratório de pesquisa em cultura do Departamento de Dentística, **Débora França**, pela sua atenção, dedicação ao funcionamento e organização do laboratório. Ao seu cuidado e atenção não só como técnica, mas muitas vezes como uma mãe.

Aos funcionários do Departamento de Dentística e do LELO, em especial a Selma e Davi, por todo suporte dado.

À bibliotecária **Glauci Elaine Damasio Fidelis**, que desde os primeiros meses nesta instituição, sempre foi muito solícita, não só durante a documentação desta dissertação, mas durante as disciplinas dos créditos da Pós-Graduação. E um fato que nunca irei me esquecer, durante a fase final de escrita desta dissertação, chegou a falar que daria um jeito e em último caso eu poderia passar o feriado na sua casa, para terminar de colocar esta dissertação nas devidas normas! Muito obrigada!

Ao **Laboratório Especial de Laser em Odontologia – Lelo – FOU SP** pela concessão do equipamento laser de diodo de baixa potencia durante o plano piloto desta dissertação, e pelo medidor de potência.

A **Heraeus** por disponibilizar os Glumas Desensitizer® utilizados nesta pesquisa.

A **DMC-Equipamentos**, por disponibilizar o equipamento laser para a execução desta pesquisa.

Ao **Departamento de Materiais Dentários**, em especial ao **Prof. Dr. Victor Arana-Chavez**, e **Prof. Dr. Fernando Neves**, por permitir que os experimentos fossem analisados no espectrofotômetro.

Às funcionárias, **Cátia e Alessandra**, da Comissão de Pós-graduação, Muito Obrigada pela prontidão em ajudar sempre.

Ao **Diretor da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (FOUSP)**, Prof. Dr. Rodney Garcia Rocha.

Aos **funcionários da portaria da FOUSP**, que guardaram e protegeram as minhas entradas e saídas na faculdade aos finais de semanas, feriados, e noites a fio, quando tinha que realizar experimentos para a realização deste trabalho. Principalmente ao Seu Zilson, por ter se preocupado quando saia tarde da noite, e por me fazer companhia durante as noites até tarde na espera de condução.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)**, pela bolsa concedida nesses anos em que estive matriculada no curso de Pós-Graduação, área de concentração em Dentística da FOUSP.

Um mestre funciona como um agente catalisador, cuja simples presença estimula...

É como quando o sol nasce pela manhã e os pássaros imediatamente começam a cantar. Eles surgem voando de todos os lados, celebrando e dando boas vindas ao novo dia através das canções. O sol não age diretamente sobre eles, mas algo acontece; o ambiente que ele cria faz com que os pássaros se sintam vigorosos, jovens e vivos.

As flores começam a desabrochar...

O sol não se está dirigindo a cada flor, forçando-a a abrir, pelo menos não de uma forma direta, entretanto, os seus raios dançam ao redor da flor, dando-lhe calor e encorajando-a delicadamente. As flores têm de ser tocadas de uma forma suave, se você forçar suas pétalas a se abrirem elas não resistirão. Você conseguirá fazer com que se abram, mas ao mesmo tempo elas morrerão. O sol simplesmente cria o clima no qual elas podem desabrochar. Um desejo interior surge dentro delas, algum instinto misterioso entra em sintonia com o calor do sol. E as flores se abrem e começam a exalar sua fragrância.

Exatamente como o trabalho do mestre...

Ele não pode entregar a você aquilo que conhece, mas pode criar um certo campo de energia no qual suas pétalas podem se abrir, no qual as suas sementes são encorajadas, em que você pode criar coragem suficiente para dar o salto, no qual o milagre torna-se possível.

Osho – Zen: The special transmission

RESUMO

Lopez TCC. Investigação dos efeitos de substâncias liberadas por materiais utilizados no tratamento da Hipersensibilidade Dentinária (Gluma e Biovidro), associados ou não à laser fototerapia, na proliferação e diferenciação de células mesenquimais de polpa dentária humana [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2013. Versão Corrigida.

A incidência da hipersensibilidade dentinária (HD) tem aumentado. Agentes dessensibilizantes como o Gluma Desensitizer® (Heraeus), ou os Biovidros, bem como tratamentos considerados bioestimuladores como a laser fototerapia (LPT) tem sido aplicados de forma isolada. Porém, esses tratamentos, embora produzam efeitos positivos, ainda não apresentam resultados duradouros. **Objetivo:** Investigar os efeitos de substâncias liberadas por materiais utilizados no tratamento da HD (Gluma e Biovidro), associadas ou não à LPT, sobre a sobrevivência, proliferação e diferenciação de células mesenquimais indiferenciadas de polpa dentária humana. **Material e Métodos:** O Gluma e o Biovidro foram aplicados às culturas celulares na forma de meios condicionados, segundo os grupos experimentais: Grupo 1 (G1) – Controle; Grupo 2 (G2) – Gluma; Grupo 3 (G3) – Biovidro; Grupo 4 (G4) – Gluma + LPT; Grupo 5 (G5) – Biovidro + LPT. A LPT foi realizada com laser de diodo semi-condutor (InGaAlP, 660 nm, área do feixe de 0,028 cm²) no modo pontual e em contato, nos seguintes parâmetros: 20 mW, 5 J/cm², 7 s, 0,14 J por ponto. No ensaio de sobrevivência e no de proliferação celular as culturas foram irradiadas ou não por duas vezes (uma imediatamente e outra 6 horas depois). A viabilidade celular foi acessada pelo ensaio de atividade mitocondrial (MTT) em 24, 48 e 72 horas após a aplicação dos meios experimentais. Para a análise de diferenciação celular as culturas foram tratadas da mesma forma, e foram irradiadas por 4 vezes (uma imediatamente e as demais em intervalos de 48 horas até 7 dias). A diferenciação foi observada pelo ensaio do Vermelho de Alizarina em 21 dias. Os dados de viabilidade celular, obtidos no mínimo em triplicata, foram tratados por ANOVA complementado pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). As imagens obtidas pelo ensaio de Vermelho de Alizarina foram analisadas qualitativamente. **Resultados:** Sobrevivência celular foi observada em todos os grupos experimentais. Culturas

controle (G1) apresentaram crescimento significativo ($p < 0,05$). Culturas tratadas com o Gluma (G2) diminuíram o número de células viáveis e quando irradiadas (G4) mantiveram esse número. Culturas tratadas com Biovidro (G3) mantiveram o número de células viáveis e apresentaram crescimento significativo quando irradiadas (G5; $p < 0,05$). Culturas controle (G1), e aquelas tratadas com Biovidro (G3) e Biovidro seguido de irradiação (G5) apresentaram diferenciação com formação de nódulos mineralizados. **Conclusão:** Substâncias liberadas pelo agente dessensibilizante (Gluma) são citotóxicas e em longo prazo a LPT é capaz de minimizar estes efeitos citotóxicos. O Biovidro libera substâncias biocompatíveis que não interferem na diferenciação das células mesenquimais indiferenciadas da polpa dentária humana permitindo a mineralização da matriz extracelular. A LPT melhora a proliferação celular e a resposta dessas células ao Biovidro.

Palavras-chave: Hipersensibilidade Dentinária. Gluma. Biovidro. Laser fototerapia. Biocompatibilidade. Proliferação. Diferenciação.

ABSTRACT

Lopez TCC Investigation of the effects of substances released by leached from materials used in the treatment of Dentine Hypersensitivity (Gluma and Bioglass), associated or not with Laser Phototherapy, in the proliferation and differentiation of mesenchymal cells from human dental pulp [dissertation]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2013. Versão Corrigida.

The incidence of Dentine Hypersensitivity (HD) has increased. Desensitizing agents such as Gluma Desensitizer[®] (Heraeus), or the Bioglasses, as well those considered biostimulatory treatments as the laser phototherapy (LPT) have been applied in an isolated manner. However, these treatments, although producing positive effects, do not have lasting results. **Objective:** To investigate the effects of substances leached from materials used in the treatment of HD (Gluma and Bioglass), associated or not to LPT, on the survival, proliferation and differentiation of mesenchymal stem cells from human dental pulp. **Material and Methods:** The Gluma and Bioglass were applied to cell cultures in the form of conditional medium, according to the experimental groups: Group 1 (G1) - Control; Group 2 (G2) - Gluma; Group 3 (G3) - Bioglass; Group 4 (G4) - Gluma + LPT; Group 5 (G5) - Bioglass + LPT. The LPT was performed with diode laser semi-conductor (InGAIP, 660 nm, spot beam size of 0.028 cm²) in punctual and contact mode, in the following parameters: 20 mW, 5 J/cm², 7 s, 0.14 J per point. In the survival and in the cell proliferation assays the cell cultures were irradiated twice (an immediately and another 6 hours after) or not. The cell viability was assessed by mitochondrial activity (MTT) assay of in 24, 48 and 72 hours after the application of experimental culture medium. For the analysis of cell differentiation the cell cultures were treated in the same way, and were irradiated by 4 times (one immediately and the other one at intervals of 48 hours up to 7 days). The differentiation was observed by testing the alizarin red in 21 days. The data of cellular viability, obtained at least in triplicate, were treated by ANOVA followed by the Tukey test ($p \leq 0.05$). The images obtained by testing of Alizarin Red were qualitatively analyzed. **Results:** cell survival was observed in all experimental groups. Control cultures (G1) showed significant growth ($p < 0.05$). Cultures treated with Gluma (G2) decreased the number of viable cells and when irradiated (G4) maintained this number. Cultures treated with Bioglass (G3) maintained the number

of viable cells and showed significant growth when irradiated (G5; $p < 0.05$). Control cultures (G1) and those treated with Bioglass (G3) and Bioglass followed by irradiation (G5) showed differentiation with formation of mineralized nodules.

Conclusion: Substances leached from the desensitizing agent (Gluma) are cytotoxic and the LPT is able to minimize these cytotoxic effects. The Bioglass releases biocompatible substances that do not disturb the differentiation of mesenchymal cells allowing the mineralization of the extracellular matrix. The LPT improves the proliferation of these cells in response of these cells to this material.

Keywords: Dentin Hypersensitivity. Gluma. Bioglass. Laser Phototherapy. Biocompatibility. Proliferation. Differentiation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 2.1 - Ilustração que demonstra o processo de indução da formação de hidroxiapatita (HA), após contato do biovidro com solução que simula o fluido corpóreo. Onde tem-se a deposição de HA sobre a superfície do biovidro. Adaptado de Siqueira e Zanotto (2011) 40
- Figura 2.2 - Ilustração sobre a hipótese do processo de regeneração tecidual após a irradiação laser. O laser pode induzir a regulação funcional da proteína HSP-25 dos odontoblastos pré-existentes. A reparação pode ocorrer de duas formas, por meio dos odontoblastos pré-existentes, ou após a morte celular por odontoblastos-símile. Os odontoblastos sobreviventes depositam dentina reacional, já se os odontoblastos morrerem as células derivadas da crista neural craniana podem diferenciar-se em novos odontoblastos, odontoblastos-símile, que imunorreagem com a HSP-25, os quais são responsáveis pela formação de dentina reparativa. As células mesodérmicas da polpa dentária (**mc**) podem diferenciar-se em células do tipo osteoblastos (**osb**) em condição patológica onde se tenha a ausência de odontoblastos e/ou de células da crista neural craniana. **cl** - lúmen capilar; **cnc** - células derivadas da crista neural cranial; **d**, dentina; **dp**, polpa dentária; **ob** - odontoblastos; **oc** - osteócito-símile; **pd** - pré-dentina; **td**, dentina terciária (Tate et al., 2006)..... 49
- Figura 4.1 - Materiais utilizados para condicionamento do meio de cultura, A - Gluma Desensitizer® (Heraeus); B - Biovidro 54
- Figura 4.2 - Eletromicrografias de varredura do biovidro após calcinação: aumento menor (a) e aumento maior (b) 55
- Figura 4.3 - Tubos tipo Falcon contendo meio condicionado. A - Tubo contendo meio a ser condicionado pelo Biovidro; B - Condicionamento das substâncias por 1 hora, realizado em estufa de CO₂ com atmosfera úmida e temperatura de 37°C; C - Tubos contendo meio condicionado, à esquerda Biovidro, à direita Gluma..... 56
- Figura 4.4 - Equipamento laser e display do laser de diodo semi-condutor (Photon Lase III, DMC-Equipamentos, São Carlos, SP, Brasil) mostrando os parâmetros utilizados..... 60
- Figura 4.5 - Dispositivo para posicionamento do laser de forma perpendicular 60

Figura 4.6 - Grupos experimentais distribuídos em 2 placas de 96 poços, sendo uma para os grupos não irradiados, e outra para os grupos irradiados.....	62
Figura 4.7 - Placa de 96 poços após a aplicação dos reagentes utilizados para o ensaio de MTT	64
Figura 4.8 - Leitor Elisa, espectrofotômetro Bio-TeK utilizado para leitura de absorbância das placas de 96 poços para o ensaio de MTT (Departamento de Biologia Oral, Bioquímica Oral, da Faculdade de Odontologia, FOUSP)	64
Figura 4.9 - Grupos experimentais distribuídos em 2 placas de 48 poços, sendo uma para os grupos não irradiados, e outra para os grupos irradiados.....	65
Figura 4.10 - A - Vermelho de Alizarina; B - placa de 48 poços com a solução de Vermelho de Alizarina; C - incubação do Vermelho de Alizarina sob leve agitação em temperatura ambiente	66
Figura 5.1 - Ilustração gráfica das porcentagens de viabilidade celular dos diferentes grupos experimentais em 24 horas após contato com os meios experimentais. *Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes ao nível de 5%.	69
Figura 5.2 - Ilustração gráfica das curvas de crescimento celular dos diferentes grupos experimentais. Somente os grupos controle (G1) e o tratado com meios condicionados pelo Biovidro e LPT (G5) apresentaram crescimento celular significativo. †Maior que o número de células do mesmo grupo no tempo de 24 horas (< 0.0001). *Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos no tempo de 72 horas..	71
Figura 5.3 - Distribuição das células nos poços de cultivo de acordo com os grupos experimentais, observadas em microscopia de contraste de fase. Lado esquerdo corresponde ao período de 14 dias após o contato com os meios experimentais. Lado direito corresponde às reações de coloração do vermelho de Alizarina no período de 21 dias após o contato com os meios experimentais. Seta na figura de 14 dias do grupo Gluma + LPT indica a presença de divisão celular. Nos grupos Controle, Biovidro e Biovidro + LPT em 21 dias são observadas estruturas nodulares enegrecidas correspondentes a nódulos de mineralização (Aumento original de 100x)	74

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALP	Fosfatase alcalina
ATP	Trifosfato de adenosina
BMP-2	Proteína morfogenética do osso 2
BMP-4	Proteína morfogenética do osso 4
BMSC	Células-tronco mesenquimais da medula óssea (<i>bone marrow stem cell</i>)
BSP	Sialoproteína óssea (<i>bone sialoprotein</i>)
CO ₂	Dióxido de carbono
CTs	Células-tronco (<i>stem cell</i>)
DeCS	Descritores em Ciências da Saúde
DGP	Glicoproteína dentinária
DMEM/Ham's F-12	Meio de eagle modificado por Dulbecco/ham's f12
DMP-1	Proteína da matriz dentinária 1 (<i>dentin matrix protein-1</i>)
DMP-2	Proteína da matriz dentinária 2 (<i>dentin matrix protein-2</i>)
DMP-3	Proteína da matriz dentinária 3 (<i>dentin matrix protein-3</i>)
DMSO	Dimetilsulfóxido
DO	Densidade ótica
DPP	Fosfoproteína dentinária (<i>dentin phosphoprotein</i>)
DPSCs	Células-tronco de polpa dentária humana (<i>dental pulp stem cells</i>)
DSP	Sialoproteína dentinária (<i>dentin sialoprotein</i>)
DSPP	Sialofosfoproteína dentinária (<i>dentin sialophosphoprotein</i>)
Er,Cr:YSGG	Erbium chromium: yttrium – scandium – gallium - garnet
Er:YAG	Erbium: yttrium – aluminum - garnet
GaAlAs	Arseneto de gálio e alumínio
HA	Hidroxiapatita
HD	Hipersensibilidade dentinária (<i>dentin hypersensitivity</i>)
HEMA	Hidroxietil de metacrilato
He-Ne	Hélio-neônio
HSP-25	Heat-shock protein

IL- β 1	Interleucina β 1
InGaAlP	Fosfeto de índio gálio alumínio
LASER	Amplificação da luz por emissão estimulada de radiação (<i>Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation</i>)
LCNC	Lesão cervical não cariosa
LPT	Laser fototerapia
MEC	Matriz extracelular
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MTT	3-(brometo de 4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio
Nd:YAG	Neodymium: yttrium – aluminum - garnet
NEAA	Aminoácidos não essenciais (<i>non essential aminoacids</i>)
NO	Óxido nítrico
PBSA	Solução tampão fosfato-salina
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SFB	Soro fetal bovino
SHEDs	Células-tronco multipotentes de dentes decíduos esfoliados (<i>stem cells from human exfoliated deciduous teeth</i>)
TGF- β 1	Fator de crescimento transformador (<i>transforming growth factor β1</i>)

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Por cento
µg	micrograma
µl	Microlitro
µm	Micrômetro
Ca ²⁺	Cálcio
CaO	Óxido de cálcio
Cm ²	Centímetro quadrado
g	Grama
h	Horas
HCl	Ácido clorídrico
J	Joule
J/cm ²	Joule por centímetro quadrado
K ⁺	Potássio
mg/mL	Miligrama por mililitro
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
mol.	Mol
mW	Mili Watts
Na ⁺	Sódio
Na ₂ O	Óxido de sódio
nM	Nanomolar
p	Nível de significância
P ₂ O ₅	Pentóxido de fósforo
seg	Segundos
Si	Silício
SiO ₂	dióxido de silício
Si-OH	Silanol
Si-O-Si	Siloxano
W	Watts
µg/mL	Micrograma por mililitro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
2 REVISÃO DA LITERATURA	24
2.1 Dentinogênese	25
2.2 Complexo dentina-polpa	26
2.2.1 Dentina	27
2.2.1.1 Tipos de Dentina	28
2.2.2 Polpa	29
2.2.2.1 Células mesenquimais indiferenciadas	29
2.3 Lesão Cervical não Cariosa	33
2.4 Hipersensibilidade Dentinária	35
2.4.1 Tratamentos para a Hipersensibilidade Dentinária	37
2.4.1.1 Biovidro	39
2.4.1.2 Laser Fototerapia	43
3 OBJETIVO	51
4 MATERIAL E MÉTODO	53
4.1 Substâncias	54
4.2 Condicionamento dos Meios de Cultivo	55
4.3 Cultivo Celular	57
4.4 Laser Fototerapia (LPT)	58
4.5 Grupos Experimentais	61
4.5.1 Ensaios Experimentais	61
4.5.1.1 Ensaio de redução do MTT	62
4.5.1.2 Ensaio de diferenciação celular	65
4.6 Análise estatística	67
5 RESULTADOS	68
5.1 Ensaio de Sobrevivência Celular	69
5.2 Ensaio de Proliferação celular	70
5.3 Ensaio de Diferenciação Celular	72
6 DISCUSSÃO	75
7 CONCLUSÕES	84
REFERÊNCIAS	86
ANEXOS	99

1 INTRODUÇÃO

Embora exista uma tendência na diminuição de lesões de cárie dentária, tem sido cada vez mais frequente a presença de indivíduos com lesões não cariosas. Este fato pode ser explicado pela mudança dos hábitos alimentares, de higiene dentária, estresse cotidiano e transtornos psicológicos.

As lesões não cariosas podem ser acompanhadas por hipersensibilidade dentinária (HD), decorrente da presença de túbulos dentinários expostos e abertos para o meio bucal, ficando estes suscetíveis a estímulos dolorosos, como por exemplo, variações de temperatura e substâncias químicas hipertônicas.

No intuito de fornecer melhor qualidade de saúde e conforto a estes indivíduos, a maioria dos tratamentos existentes para a HD visam promover analgesia e obliteração dos túbulos dentinários, através do uso de agentes dessensibilizantes. Porém, a maior parte desses tratamentos não são efetivos e duradouros. Tornando-se necessárias novas aplicações em um curto espaço de tempo.

Os agentes dessensibilizantes podem ser divididos de acordo com o seu mecanismo de ação: oclusão dos túbulos dentinários ou bloqueio da transmissão neural, na forma de dentifrícios, colutórios, géis ou adesivos. O Gluma Desensitizer® (Heraeus) é uma agente dessensibilizante que tem mostrado resultados promissores em ensaios clínicos. Este material contém em sua fórmula hidroxietil de metacrilato (HEMA), cloreto de benzalcônio, glutaraldeído e flúor. Em termos gerais, este material promove a oclusão túbulos dentinários, devido à presença do HEMA que forma profundos tags, e do glutaraldeído que leva à coagulação de proteínas presentes nos túbulos dentinários, e à precipitação de albumina presente no fluido dentinário.

Mais recentemente, um novo material bioativo, o Biovidro, foi introduzido para tratamento da HD, este biomaterial apresenta biocompatibilidade, induz a migração, adesão, proliferação e diferenciação celular. Adicionalmente, a laserterapia tem

apresentado bons resultados em estudos *in vitro* e clínicos no tratamento da HD. Para o tratamento da HD podem ser empregados os lasers de alta potência: Nd:YAG; Er:YAG; Er,Cr:YSGG; CO₂, ou ainda, os lasers de baixa potência: He-Ne, GaAlAs. A laser fototerapia (LPT) possui efeito biomodulador, no entanto, o mecanismo de ação dessa terapia sobre o tratamento da HD ainda não está bem elucidado. Além disso, não existem na literatura estudos *in vitro* analisando os efeitos da associação da LPT com outros agentes dessensibilizantes, como Gluma e Biovidro.

Com o uso dessas substâncias que ocluem os túbulos dentinários abertos para o tratamento da HD, internamente, nos túbulos estas substâncias estarão em contato direto com o fluido dentinário e, portanto, sujeitas à solubilização neste fluido, que em última instância entrará em contato com as células pulpares. Com o cultivo celular se pode mimetizar esta situação clínica *in vitro* através do uso de meios condicionados pelos materiais com potencial dessensibilizante. Estes meios contêm as substâncias liberadas por estes materiais e podem ser colocados em contato com células plaqueadas. Assim, se pode estudar a respostas destas células.

Neste sentido, o objetivo deste estudo foi o de investigar os efeitos de substâncias liberadas por materiais utilizados no tratamento da HD (Gluma e Biovidros), com potencial de ocluir mecanicamente túbulos dentinários abertos, com a laser fototerapia (LPT), capaz de induzir resposta pulpar reparativa. Para tanto, este estudo analisou o efeito de substâncias liberadas por estas substâncias, associados ou não, à LPT na sobrevivência, proliferação e na diferenciação de células mesenquimais indiferenciadas de polpa dentária humana.

REVISÃO DA LITERATURA

2 REVISÃO DA LITERATURA

A revisão de literatura desta Dissertação foi dividida nos seguintes temas: Dentinogênese, Lesões Cervicais Não Cariosas, Hipersensibilidade Dentinária e suas opções de tratamento. Esta divisão foi delineada no intuito de facilitar a compreensão no que envolve a hipersensibilidade dentinária e suas possíveis formas de tratamento, com vistas ao emprego de uma terapêutica mais eficiente e duradora.

2.1 Dentinogênese

Segundo o Descritores de Ciências da Saúde (DeCS), dentinogênese é o processo de formação da dentina (Descritores de Ciências da Saúde - DeCS, 2013). Basicamente, este processo acontece em duas etapas: formação da matriz orgânica, ou pré-dentina; e mineralização da matriz (Smith et al., 1995).

A polpa e a dentina, embora sejam histologicamente diferentes, apresentam a mesma origem embriológica, ou seja, a partir do ectomesênquima (Orchardson; Cadden, 2001; Cate, 2008). Possuem ainda, muitas características em comum, como relação topográfica e função (Katchburian, 2004; Ferraris, Munõz, 2006; Cate, 2008).

O primeiro evento da dentinogênese é a diferenciação das células ectomesenquimais, localizadas na periferia da papila dentária (polpa primitiva), em odontoblastos. Esta diferenciação é mediada por matriz extracelular, fatores de crescimento, como fator de crescimento transformador (do inglês - *transforming growth factor* β 1 - TGF- β 1), proteína morfogenética do osso (BMP-2 e BMP-4) e integrinas (Katchburian, 2004; Nakashima et al., 1994; Shiba et al., 1998). Outros fatores que podem regular a proliferação e diferenciação dos precursores de odontoblastos são os fatores de crescimento de fibroblastos (do inglês - *fibroblast growth factor* – FGF), fatores de crescimento derivados de plaquetas, fatores de

crescimento epidérmico, semelhante à insulina, fator de crescimento I, fator de necrose tumoral- α e IL- β 1 (Shiba et al., 1998).

Durante a formação da dentina, conforme os odontoblastos sintetizam proteínas e depositam matriz, estes se deslocam em um movimento centrípeto em direção à polpa. Neste momento, prolongamentos citoplasmáticos dos odontoblastos ficam contidos na matriz recém-sintetizada, formando uma estrutura canicular, os túbulos dentinários. No interior destes, os prolongamentos dos odontoblastos se encontram permeados pelo fluido dentinário, com uma parte da estrutura celular conectada a terminações nervosas localizadas na polpa. O corpo celular dos odontoblastos se encontra na camada odontoblástica subjacente à pré-dentina, localizado na periferia da polpa (Garone Netto et al., 2003; Busato, 2005; Cate, 2008; Katchburian, 2004; Smith et al., 2008).

Sendo assim, polpa e dentina se apresentam intimamente conectadas, formando o complexo dentina-polpa. Logo, estímulos, reações fisiológicas ou patológicas aplicados na dentina podem ser captados pela polpa (Garone et al., 2003; Busato, 2005; Smith, 2008).

2.2 Complexo dentina-polpa

Como visto a dentina e polpa são estruturas que se apresentam intimamente relacionadas, desde a formação até o dente completamente formado, constituindo o complexo dentina-polpa (Harada et al., 2008). Sendo assim, nesta revisão, as duas estruturas serão abordadas na mesma seção.

2.2.1 Dentina

Na odontogênese, o processo de formação da dentina envolve etapas de diferenciação celular e ainda, ocorrem interações entre o epitélio e o mesenquima que permitem à diferenciação de células ectomesenquimais derivadas de células da crista neural em odontoblasto, a célula constituinte da dentina (Sun et al., 1998).

A dentina é um tecido conjuntivo denso especializado, elástico, mineralizado, avascular e acelular, porém ramificações dos prolongamentos de odontoblastos estão incluídas em sua matriz (Cate, 2008). Constitui-se de aproximadamente 70% de material inorgânico, principalmente cristais de hidroxiapatita, 20% de material orgânico e 10% de água por peso (Cate, 2008). A parte orgânica consiste em 90% de colágeno, e 10% de proteínas não colágenas da matriz, a saber: sialofosfoproteína dentinária (DSPP) que se desdobra em sialoproteína dentinária (DSP) e fosfoproteína dentinária (DPP) (considerando-as juntas, representam a maior parte das proteínas não colágenas da matriz na dentina); proteínas da matriz dentinária 1, 2, 3 (DMP-1, DMP-2, DMP-3); glicoproteína dentinária (DGP); osteonectina; osteocalcina; sialoproteína óssea (BSP); osteopontina; fosfoglicoproteína extracelular da matriz; proteoglicanas; proteínas serosas e proteínas morfogenéticas dentinárias (Katchburian, 2004; Cate, 2008; Goldberg et al., 2011).

Inicialmente, a dentina é depositada como uma camada de matriz não mineralizada, a pré-dentina, que reveste a porção pulpar mais interna, separando os odontoblastos da dentina mineralizada. (Katchburian, 2004; Cate, 2008). A pré-dentina se mineraliza em dentina, conforme proteínas não colágenas da matriz são incluídas na frente de mineralização (Cate, 2008).

2.2.1.1 Tipos de Dentina

A dentina primária é formada até o fechamento do ápice radicular. Já a dentina formada após o fechamento, é denominada dentina secundária (Smith et al., 1995; Katchburian, 2004). A dentina terciária é formada frente a estímulos, e pode ser de dois tipos, reacional ou reparativa (Katchburian, 2004; Ferreira et al., 2006; Harada et al., 2008).

A resposta pulpar, em direção a uma resposta reparativa ou não, depende do agente agressor e sua intensidade. Quando da presença de agentes agressores menos intensos, é formada uma camada de dentina terciária do tipo reacional depositada por odontoblastos sobreviventes com o objetivo de manter o agente agressor afastado da polpa. A estrutura dentinária formada se apresenta irregular e os túbulos dentinários se dispõem desordenadamente (Smith et al., 1995; Katchburian, 2004).

Em meio a fatores mais intensos, a dentina terciária do tipo reparativa é produzida após uma série de eventos, que envolve a divisão, quimiotaxia, migração, adesão e diferenciação celular (Smith et al., 1995; Smith et al., 2012). Esta dentina é formada por células mesenquimais indiferenciadas da polpa, que se diferenciam em odontoblasto-símile (do inglês - *odontoblast-like*), visto que os odontoblastos não estão mais presentes, originando um tecido do tipo osteóide, também denominado ponte de dentina reparativa, onde se observa desde túbulos pouco regulares, a um aspecto atubular (Smith et al., 1995; Katchburian, 2004; Cate, 2008; Smith et al., 2012).

Estudo realizado em molares de ratos após preparos cavitários, Harada e colaboradores observaram que células indiferenciadas presentes na camada subodontoblástica migram e se diferenciam em novas células do tipo odontoblasto símile, compensando a camada odontoblástica perdida após o preparo cavitário, posteriormente, a reorganização da polpa dentária foi concluída pela proliferação ativa das células mesenquimais presentes na polpa (Harada et al., 2008).

2.2.2 Polpa

A polpa dentária é um tecido conjuntivo frouxo, não mineralizado, composto por matriz extracelular e tipos celulares como fibroblastos, células nervosas, vasculares e indiferenciadas, que ocupa a região central do elemento dentário, da coroa ao ápice. Apresenta duas camadas periféricas, a camada de odontoblastos e a camada subodontoblástica (Cate, 2008; Katchburian, 2004).

A camada de odontoblastos é a região mais periférica da polpa, e os odontoblastos após formarem a dentina, mantem com esta íntima relação, uma vez que os prolongamentos citoplasmáticos dos odontoblastos ficam retidos no interior dos túbulos dentinários. Já a camada subodontoblástica esta localizada abaixo da camada de odontoblastos, e é dividida em: zona pobre em células, mais periféria, e zona rica em células subjacente à zona pobre em células (Katchburian, 2004).

A zona pobre em células (Weill) contém os prolongamentos de células subjacentes, vasos e fibras nervosas. As fibras nervosas, principalmente do tipo amielílico, se direcionam à camada de odontoblastos, podendo atingir a pré-dentina e a região inicial dos túbulos dentinários. A zona rica em células contém as células mesenquimais indiferenciadas, fibroblastos e os corpos celulares das células que emitem seus prolongamentos para a zona pobre em células (Katchburian, 2004).

2.2.2.1 Células mesenquimais indiferenciadas

As células mesenquimais indiferenciadas, também chamadas de células-tronco (CTs), apresentam estrutura semelhante aos fibroblastos. Situam-se normalmente ao redor de capilares e pequenos vasos sanguíneos no tecido conjuntivo frouxo (Van De Graaff, 2003).

Pesquisas utilizando células-tronco tem sido desenvolvidas com vistas a utilização destas células na terapia celular, engenharia celular, e Odontologia regenerativa, obtendo-se resultados promissores.

Em termos gerais, células-tronco (CTs), do inglês *stem cell*, são células indiferenciadas que possuem a capacidade de multiplicar-se e de diferenciar-se no tecido a que pertencem ou até mesmo em outros tecidos, caso recebam o estímulo necessário para tal. Podem ser classificadas quanto à origem (embrionárias, pós-natais e adultas) e/ou quanto à sua potencialidade (totipotente, pluripotente e multipotente) (Jiang et al., 2002; Ulloa-Montoya et al., 2005).

De acordo com a classificação quanto à origem, as CTs embrionárias são aquelas presentes no embrião (de 1 a 3 dias de vida), as CTs adultas são células indiferenciadas que podem ser encontradas em alguns tecidos de um indivíduo adulto, ou já formado. A exemplo da medula óssea, retina, músculo esquelético, fígado, placenta, cordão umbilical e polpa dentária (National Institutes Of Health - NIH, 2006; Kerkis et al., 2006).

As células totipotentes são aquelas com capacidade de originar todos os tipos celulares. Correspondem às células do embrião recém-formado e apresentam potencial para originar todos os tipos celulares de origem embrionária e extra-embrionária. As células pluripotentes possuem a capacidade de originar qualquer tipo celular, com exceção do organismo completo uma vez que não conseguem formar tecidos de apoio ao feto. Apresentam ainda a capacidade de originar todos os tipos embrionários (mais de 200 tipos celulares). Células multipotentes são aquelas com potencial de originar vários tipos celulares (Wagers; Weissman, 2004).

As CTs adultas apresentam capacidade de auto-renovação e diferenciação um pouco mais limitada (multipotente) quando comparadas às células-tronco embrionárias. Porém, atualmente já se sabe que o potencial de diferenciação destas células é maior do que se imaginava (Blau et al., 2001).

Células indiferenciadas da polpa dentária humana podem atuar como CTs adultas multipotentes. Gronthos e colaboradores isolaram e caracterizaram células presentes na polpa dentária de terceiros molares humanos pela primeira vez, denominando-as de células-tronco de polpa dentária pós-natal (*dental pulp stem cells* - DPSCs). Neste estudo, as DPSCs foram comparadas com as células-tronco mesenquimais da medula óssea (*bone marrow stroma cell* - BMSC) onde observaram que as DPSCs apresentavam alguns nódulos de mineralização, porém sem a presença de adipócitos, mas presentes nas BMSC. Quando as DPSCs foram

transplantadas em camundongos imunocomprometidos, elas foram capazes de formar uma estrutura semelhante à dentina, formando um complexo semelhante ao complexo dentina-polpa. Quando cultivadas em meio mineralizante as DPSCs demonstraram a capacidade de formar nódulos com altos níveis de cálcio, através ensaio de vermelho de Alizarina (Gronthos et al., 2000).

Posteriormente, foram isoladas e caracterizadas células-tronco multipotentes de dentes decíduos esfoliados (*stem cells from human exfoliated deciduous teeth* - SHEDs) (Miura et al., 2003). Neste estudo Miura e colaboradores verificaram através do ensaio de vermelho de Alizarina a diferenciação das SHEDs em tecido mineralizado, indicando o acúmulo de cálcio *in vitro*. E após o transplante em camundongos imunocomprometidos puderam detectar a diferenciação das SHEDs em odontoblastos, associados à estrutura semelhante à dentina (*dentin-like*).

Estudos mais recentes tem demonstrado que as DPSCs quando em combinação com um material polimérico, são capazes de produzir um tecido conjuntivo semelhante à polpa dentária após o transplante subcutâneo em ratos imunocomprometidos (Cordeiro et al., 2008; Sakai et al., 2010; Galler et al., 2012).

Em estudo comparativo entre BMSSC (*bone marrow stromal stem cells*) e as DPSCs, Yu e colaboradores verificaram uma capacidade mais ativas de diferenciação odontogênica das DPSCs *in vitro*, em comparação as BMSSC, através da formação de matriz mineralizada, aumento da atividade da fosfatase alcalina (ALP) e expressão do gene *DSPP*, e *in vivo*, com a produção de estruturas semelhantes à osteodentina (Yu et al., 2007).

O processo de diferenciação das DPSCs é dinâmico e envolve uma série de eventos como aumento da expressão de genes relacionados à produção de proteínas da matriz extracelular dentinária e o aumento da atividade de enzimas envolvidas no mecanismo de mineralização da matriz produzida. Como consequência desses eventos tem-se, *in vitro*, a formação de nódulos de matriz mineralizada caracterizados por alto conteúdo de cálcio.

Em meio a um processo de injúria pulpar (preparo cavitário, lesão de cárie, lesões cervicais não cariosas que apresentem túbulos dentinários expostos para o meio bucal e que constantemente sofram com agentes externos, a exemplo de

ácidos provenientes da dieta) os odontoblastos presentes podem não mais existir, e nesta situação células mesenquimais indiferenciadas da polpa dentária humana poderiam ser recrutadas e sofrerem diferenciação em novos odontoblastos, odontoblastos-símile os quais seriam responsáveis pela formação de dentina do tipo reparativa (Tate et al., 2006).

2.3 Lesão Cervical não Cariosa

Mudanças de hábitos de dieta e higiene associadas ao aumento da longevidade da população tem resultado na diminuição da incidência de lesões de cárie dentária e aumento da permanência dos dentes no arco dental. Por outro lado, distúrbios e hábitos parafuncionais, tem levado à maior incidência de lesões cervicais não cariosas (LCNC) e exposição dentinária para o meio bucal (Wood et al., 2008).

As lesões cervicais não cariosas são caracterizadas pela perda de estrutura dentária no terço cervical na região da junção amelocementária (Levitch et al., 1994), podendo atingir a região da raiz subjacente. Não apresenta envolvimento bacteriano, sendo assim, não está relacionada à cárie (Michael et al., 2010).

A prevalência das LCNC pode variar de 0 a 90% (Järvinen et al., 1991; Levitch et al., 1994; Michael et al., 2010; Wood et al., 2008). A grande variação entre esses valores pode ser justificada pela diferença encontrada entre os desenhos experimentais, parâmetros, metodologias, população e tamanho da amostra, utilizados nesses estudos epidemiológicos (Levitch et al., 1994; Wood et al., 2008; Michael et al., 2010). Porém, todos os estudos mostram uma tendência no aumento da prevalência com o aumento da idade (Levitch et al., 1994; Wood et al., 2008). E também tem sido relatado o aumento da severidade das lesões com o aumento da idade (Levitch et al., 1994).

As lesões afetam principalmente a face vestibular, porém a face lingual e proximal também pode ser acometida (Levitch et al. 1994; Michael et al., 2010). Os dentes mais acometidos são os caninos e pré molares.

A etiologia das LCNC é considerada por muitos pesquisadores como multifatorial (Levitch et al., 1994; Wood et al., 2008). As LCNC podem ser provocadas por abrasão, erosão ou abfração, mas estudos mostram que muitas vezes mais de um fator pode estar atuando concomitantemente (Levitch et al., 1994; Bartlett; Shah, 2006; Michael et al., 2010).

A erosão é a perda do tecido dentário provocada por componentes químicos, sem o envolvimento bacteriano. É resultado da dissolução da matriz inorgânica dos tecidos em resposta a ação de componentes ácidos. Pode ser resultado de fatores extrínsecos e intrínsecos. Os fatores extrínsecos são aqueles decorrentes da alimentação, bebidas (Scaramucci et al., 2011; Scaramucci et al., 2012), cloro da água de piscina, e medicamentos (Levitch et al., 1994). Os fatores intrínsecos estão relacionados a distúrbios alimentares, como bulimia e anorexia nervosa, refluxos decorrentes de problemas gastrointestinais, como esofagite e úlcera duodenal, gravidez, alcoolismo (Levitch et al., 1994; Järvinen et al., 1991), e quantidade e qualidade da saliva produzida.

A abrasão é o desgaste do tecido dentário decorrente da ação mecânica, como por exemplo, provocada pela escovação inadvertida. É comum a associação da presença de lesão cervical com recessão gengival e boa escovação. Os fatores relacionados ao paciente incluem tempo gasto na escovação, frequência, força aplicada, e em que arco a escovação é iniciada. Indivíduos com LCNC destros apresentam mais lesões no arco esquerdo, e canhotos no arco direito. Os fatores relacionados aos materiais incluem tipo de cerda, quantidade e abrasividade do dentífrico (Levitch et al., 1994).

Tem sido proposto que após o início da lesão por erosão, à região inicialmente desmineralizada pela ação de ácidos, é potencializada pelo desgaste mecânico promovido pela abrasão.

A lesão do tipo abfração é provocada pelo rompimento dos cristais de esmalte e de dentina, como resultado das tensões de tração/compressão, geradas pela flexão do dente durante movimentos oclusais em desarmonia, como forças oclusais excêntricas, e o bruxismo. A força gerada pode levar ao rompimento da união dos cristais de hidroxiapatita, promovendo a perda de esmalte, e às vezes da dentina subjacente. A região de fulcro, durante o movimento de flexão dos dentes é onde as forças oclusais estão concentradas, e está localizada na região cervical (Levitch et al., 1994). A palavra abfração é derivada do latim "romper" (Wood et al., 2008).

O conhecimento a cerca da etiologia da lesão é importante para a definição do plano de tratamento, que tem por finalidade a prevenção da formação de novas

lesões, além de impedir a progressão da lesão já existente (Levitch et al., 1994; Wood et al., 2008).

Os agentes etiológicos devem ser removidos para que se tenha um tratamento mais próximo da efetividade, ou seja, se o fator etiológico não for removido, o tratamento será ineficiente (Levitch et al., 1994).

O diagnóstico das LCNC é feito através da anamnese, inspeção visual e teste tátil. Quando o diagnóstico não está claro, pode ocorrer dificuldade em se estabelecer um tratamento efetivo. Em alguns casos, as LCNC são apenas monitoras, através da preservação do caso (Michael et al., 2010).

As LCNC por promoverem a exposição do tecido dentário para o meio bucal, podem atingir a polpa e provocar o comprometimento da vitalidade pulpar (Levitch et al., 1994; Michael et al., 2010), além de facilitar o acúmulo de biofilme (Michael et al., 2010), e levar ao aparecimento da hipersensibilidade dentinária (HD) (Levitch et al., 1994; Aranha, 2005; Sobral, 2010; Garone Filho; Silva, 2008; Michael et al., 2010).

2.4 Hipersensibilidade Dentinária

A HD é definida como lesão acompanhada de dor aguda de curta duração decorrente da dentina exposta, mais especificamente, de túbulos dentinários expostos e abertos, que ocorre em resposta a estímulos (Addy, 1990; Holland et al., 1997; Miglani et al., 2010). A frequência da HD pode variar de 4 a 74% (Irwin, McCusker, 1997), sendo ligeiramente maior em mulheres, e pode acometer indivíduos de qualquer idade, porém é mais frequente na faixa etária entre 20 e 50 anos, com pico entre 25 e 40 anos de idade (Gillam et al., 2002). Os dentes mais acometidos são os caninos e pré-molares, e a face vestibular da região cervical é o local mais afetado (Miglani et al., 2010).

Recessão gengival devido à cirurgia de redução de bolsa, preparo do dente para a coroa, uso excessivo de fio dental ou doenças periodontais são possíveis causas da HD (Dababneh et al., 1999; Conceição et al., 2007; Curtis et al., 2010;

Miglani et al., 2010; Yilmaz et al., 2011b). A HD também pode ocorrer na presença de lesões cervicais não cariosas, ou seja, lesões causadas por agentes não bacterianos (Garone Netto et al., 2003; Aranha, 2005; Orchardson; Gillam, 2006; Conceição et al., 2007).

Existem algumas teorias que tentam explicar os mecanismos da HD. Em uma delas as fibras nervosas localizadas no início dos túbulos, seriam atingidas pelos estímulos aplicados a dentina. Os axônios não estão presentes em todos os túbulos, e quando presentes se encontram apenas na porção inicial dos túbulos dentinários, e com isso a sensibilidade na dentina superficial não poderia ser explicada. Na outra, os odontoblastos e seus prolongamentos atuariam como receptores sensoriais (Katchburian, 2004).

Porém, a teoria mais aceita pela literatura é a teoria hidrodinâmica de Brännström (1964). Esta teoria está baseada na presença e movimentação do fluido dentinário, que ativa as terminações nervosas presentes na porção pulpar dos túbulos dentinários. A resposta destas terminações nervosas, principalmente fibras aferentes A, depende da intensidade dos estímulos aplicados sobre a dentina exposta, que podem ser: resfriamento, secagem ou evaporação, estímulo tátil e aplicação de substâncias químicas hipertônicas (Pashley, 1996; Holland et al., 1997; Garone Netto et al., 2003; Conceição et al., 2007; Miglani et al., 2010).

É provável que dependendo do estímulo aplicado, intensidade, região e profundidade da dentina, vários mecanismos estejam envolvidos simultaneamente (Katchburian, 2004).

2.4.1 Tratamentos para a Hipersensibilidade Dentinária

Com intuito de proporcionar ao indivíduo melhor qualidade de vida e saúde, o tratamento da HD deve ser iniciado após diagnóstico preciso, excluindo outras possíveis doenças que possam ser a causa da dor. Para o diagnóstico há que se detectarem possíveis locais de dentina exposta, que devem ser testados com estímulos que possam provocar dor. Os estímulos mais utilizados para detectar a HD nos pacientes é o jato de ar, pois apresenta a combinação de um estímulo térmico com o estímulo de pressão (Ide et al., 2001), mas também é recomendado a utilização da sonda exploradora, aplicada no sentido méso-distal (Miglani et al., 2010). Diante do diagnóstico da HD, no sentido de determinar a terapêutica a ser implementada, devem ser identificados os possíveis fatores causais da exposição dos túbulos dentinários à cavidade bucal (Dowell et al., 1985). Em casos de presença de lesão não cariosa, as suas causas devem ser detectadas e eliminadas para evitar recidivas e maiores desconfortos (Aranha, 2005; Miglani et al., 2010).

O tratamento da HD apresenta como principais objetivos a promoção da analgesia (inibição da atividade sensorial) e/ou obliteração dos túbulos dentinários (Aranha, 2005; Miglani et al., 2010). Assim sendo, o tratamento mais empregado tem sido a utilização dos agentes dessensibilizantes.

O agente dessensibilizante dentinário considerado ideal é aquele que apresenta: ação rápida, efeitos em longo prazo, não irritante à polpa (biocompatível), indolor, de fácil aplicação, e que não altere a coloração do dente (Grossman, 1935). Os agentes dessensibilizantes podem ser divididos de acordo com o seu mecanismo de ação: oclusão dos túbulos dentinários ou bloqueio da transmissão neural, na forma de dentifrícios, colutórios, géis ou adesivos dentinários (Miglani et al., 2010).

A obliteração dos túbulos dentinários pode ser promovida por compostos, tais como: fluoreto de sódio, fluoreto estanhoso, cloreto de estrôncio, oxalato de potássio, fosfato de cálcio, carbonato de cálcio; por precipitação de proteína obtida com o uso de: glutaraldeído, nitrato de prata, cloreto de zinco, hexahidrato de cloreto de estrôncio; ou por agentes adesivos, como: cimentos adesivos dentinários, vernizes fluoretados, ácido oxálico e resina, cimentos de ionômero de vidro,

compósito e agentes de adesão dentinária. Enquanto que a dessensibilização do nervo ocorre principalmente pelo uso de nitrato de potássio (Miglani et al., 2010).

Contudo, tem sido reportado na literatura que devido à maioria dos tratamentos existentes não aderir adequadamente à estrutura dentinária, estes tratamentos não apresentam efeito a longo prazo (Orchardson; Gilliam, 2006).

O Gluma Desensitizer[®] (Heraeus) foi desenvolvido a mais de uma década com o propósito de tratamento da HD (Ishihata et al., 2011), e tem mostrado resultados promissores nos ensaios clínicos (Aranha et al., 2009; Yu et al., 2010; Brahmbhatt et al., 2012; Lopes; Aranha, 2013). Este material contém em sua fórmula hidroxietil de metacrilato (HEMA), cloreto de benzalcônio, glutaraldeído e flúor. O HEMA forma profundos *tags* de resina, ocluindo os túbulos dentinários. (Irwin; McCusker, 1997; Aranha, 2003; Aranha et al., 2009; Miglani et al., 2010). O glutaraldeído promove a coagulação das proteínas presentes no interior dos túbulos dentinários, reage com o soro de albumina do fluido dentinário, causando a sua precipitação (Miglani et al., 2010; Ishihata et al., 2011).

Sabe-se que o GLUMA contém agentes tóxicos, como glutaraldeído, cloreto de benzalcônio e HEMA. É importante que se conheça os efeitos dos agentes dessensibilizantes quando em contato com os tecidos orais, como por exemplo, do contato com fibroblastos e queratinócitos, uma vez que durante a aplicação clínica deste material pode ocorrer íntimo contato com estes tecidos (Sengun et al., 2006; Ishihata et al., 2011).

Estudo realizado por Sengun e colaboradores, onde avaliaram o efeito de agentes dessensibilizantes (Gluma Desensitizer, Seal&Protect e MicroPrime) na viabilidade e morfologia de fibroblastos verificaram que a citotoxicidade foi variável e dependente da composição e período de exposição dos agentes às culturas celulares. No tempo experimental 48 h o crescimento celular foi inibido em todos os grupos experimentais, que pode ser observado através da contagem de células viáveis utilizando o ensaio de MTT e análise morfológica (Sengun et al., 2006).

2.4.1.1 Biovidro

Mais recentemente um novo material, o biovidro, foi introduzido para tratamento da HD (Lee et al., 2007; Kuo et al., 2007; Curtis et al., 2010; Bakry et al., 2011a; Bakry et al., 2011b; Sauro et al., 2011). Os biovidros são materiais cerâmicos amorfos que podem ser bioativos ou bioabsorvíveis, dependendo da sua composição química. O primeiro biovidro foi sintetizado por Hench e colaboradores (Hench et al., 1972). Inicialmente foi desenvolvido com a finalidade de estimular a formação de tecido ósseo (Baino et al., 2013). E atualmente, tem sido utilizado em Ortopedia para promover união entre implante e osso, e em Odontologia para preenchimento ósseo, como por exemplo, durante tratamento cirúrgico e periodontal (Cruz et al., 2006; Huan et al., 2011; Margonar et al., 2012). No tratamento da HD tem sido empregado na fabricação de alguns produtos comerciais, como por exemplo, no dentifrício NovaMin[®] (NovaMin Technology Inc., FL, EUA) e (Sensodyne[®] Repair & Protect - com tecnologia NovaMin[®]) (Miglani et al., 2010).

Com exceção dos vidros bioativos de boratos, todos os demais vidros bioativos são vidros silicatos. O mecanismo de interação do biovidro com os tecidos ocorre uma vez que, as ligações Si-O-Si da superfície vítrea são clivadas quando em contato com o fluido corpóreo, formando ligações Si-OH (silanol) que configuram uma camada de silanol sobre a superfície vítrea. Esta camada de silanol favorece a nucleação (etapa em que as moléculas do soluto dispersas no solvente começam a se juntar) de hidroxiapatita na sua superfície (Miglani et al., 2010).

Hench descreveu o processo de bioatividade do biovidro, mostrando que primeiramente ocorre troca de íons de sódio e cálcio do biovidro, com prótons no ambiente biológico, seguido pela clivagem das ligações Si-O-Si da rede tetraédrica de sílica e precipitação de uma camada de fosfato de cálcio amorfa sobre a superfície de gel de silanol, na qual a hidroxiapatita é nucleada. A nucleação do fosfato de cálcio amorfo em hidroxiapatita é um processo termodinamicamente favorável nas condições fisiológicas, fator o qual é responsável pelo desencadeamento da bioatividade deste material. As etapas posteriores estão relacionadas com a ligação de proteínas à superfície do biovidro, a adesão celular e a dissolução contínua do biovidro (Hench, 1991; Ducheyne; Qiu, 1999; Cormack;

Tilocca, 2012). A bioatividade dos vidros bioativos se completa quando a camada superficial de hidroxiapatita liga-se quimicamente aos tecidos adjacentes, esta ligação química entre o biomaterial e o tecido adjacente é o que caracteriza um vidro bioativo (Hench, 1991; Cormack; Tilocca, 2012) (Figura 2.1).

Figura 2.1 – Ilustração que demonstra o processo de indução da formação de hidroxiapatita (HA), após contato do biovidro com solução que simula o fluido corpóreo. Onde tem-se a deposição de HA sobre a superfície do biovidro. Adaptado de Siqueira e Zanotto (2011)

A composição inicial do biovidro ($\text{SiO}_2\text{-P}_2\text{O}_5\text{-CaO-Na}_2\text{O}$) em (% mol.) desenvolvida por Hench e colaboradores é: SiO_2 - 46,1; P_2O_5 - 2,6; CaO - 26,9; Na_2O - 24,4 (Baino et al., 2013). O biovidro original, (Bioglass 45S5), é derivado de um vidro fundido, maneira tradicional de obter os biovidros.

No entanto, existem algumas composições em que o vidro apresenta uma maior facilidade de se cristalizar durante seu resfriamento após sua fusão e retirada do forno (Peitl Filho et al., 1996). Esta cristalização, no entanto, é conhecida por reduzir a bioatividade do material (Hench, 1991; Siqueira; Zanotto, 2011). Neste sentido, trabalhos tem sido desenvolvidos com o objetivo de encontrar composições que não cristalizem, de forma a evitar a redução da bioatividade destes materiais (Brink, 1997; Brink et al., 1997). Nestes estudos os autores mostraram que biovidros contendo de 45 a 59% mol. de SiO_2 apresentam propriedade bioativa (Brink, 1997; Brink et al., 1997).

Sabe-se que além da estrutura química, a estrutura de superfície dos biomateriais influenciam sobre o comportamento das células, onde superfícies na escala nanométrica, parecem ser as com maior potencial de bioatividade, pelo menos quanto à adesão de osteoblastos (Anselme, 2000; Tilocca, 2011).

Justificando a sua utilização no tratamento da HD, tem sido relatado que o biovidro promove obliteração e remineralização da dentina tubular (Forsback et al., 2004; Bakry et al., 2011b; Miglani et al., 2010). Este material apresenta biocompatibilidade, propriedades osteocondutoras (Poinern et al., 2009), osteoindutoras (LeGeros, 1993) e osteogênicas devido aos produtos da dissolução do biovidro, permitindo migração, proliferação e diferenciação celular (Cormack; Tilocca, 2012). Sua composição química permite que exiba um comportamento biocompatível com os tecidos dentais, além de apresentar efeito antibacteriano, pouco efeito citotóxico, quando comparado a outros materiais com a mesma finalidade, e oclusão dos túbulos expostos, diminuindo a condução de estímulos hidrodinâmicos (Forsback et al., 2004; Lee et al., 2007; Kuo et al., 2007; Hu et al., 2009; Curtis et al., 2010; Bakry et al., 2011a; Bakry et al., 2011b).

Sauro e colaboradores realizaram um recente estudo com o intuito de verificar a capacidade de substâncias bioativas contidas em materiais na promoção da oclusão e remineralização dos túbulos dentinários. O biovidro SYLC (Osspray Ltd, Londres, UK) foi o único material capaz de reduzir a permeabilidade da dentina, após imersão em solução remineralizante (RSS), por mostrar a precipitação de hidroxiapatita dentro dos túbulos e sobre a superfície dentinária (Sauro et al., 2011).

Estudos tem mostrado que esta obliteração dos túbulos dentinários é resistente à escovação, aos desafios de desgaste e abrasão. Com isso tem-se a possibilidade de utilizar este material para tratamento da HD, com vistas a uma terapia mais duradoura (Bakry et al., 2011b; Curtis et al., 2010).

Neste mesmo sentido, Lee e colaboradores verificaram que o biovidro experimental (DP-bioglass) foi capaz de ocluir 55.8 - 62.7 μm dos túbulos de dentina exposta. Este material foi significativamente melhor que os outros grupos experimentais (One Coat Bond e Seal & Protect) (Lee et al., 2007).

Além de estudos sobre o potencial deste biomaterial na indução da oclusão e remineralização da dentina, pode-se verificar uma preocupação sobre o comportamento destes frente às células da polpa dentária. Para tanto, Kuo e colaboradores avaliaram o efeito citotóxico da pasta DP-bioglass (biovidro experimental) e DP-bioglass associada a 30% de ácido fosfórico (associação esta que tem sido sugerida para o tratamento da HD) sobre células de polpa dentária humana. Onde verificaram que após três dias de contato dos materiais com as células, o DP bioglass apresentou significativa biocompatibilidade (Kuo et al., 2007).

Frente às características deste biomaterial, o seu emprego na HD possibilita uma modalidade de tratamento para a HD com vistas a um tratamento eficaz e durador. Uma vez que este biomaterial além de ser biocompatível, promove migração, proliferação e diferenciação celular, podendo resultar na formação de dentina terciária, que mesmo na presença de inúmeros tratamentos, ainda é a barreira mais eficaz e duradoura para obliterar os túbulos dentinários.

2.4.1.2 Laser Fototerapia

A laser fototerapia (LPT), também denominada de Terapia com Laser de Baixa Potência (*Low Power Laser Therapy* - LPLT), Terapia com Laser em Baixa Intensidade (*Low Intensity Laser Therapy* - LILT, ou *Low Level Laser Therapy* - LLLT) e Fototerapia com Laser em Baixa Intensidade (FTLBI), tem sido utilizada em várias áreas da Odontologia, como, Cirurgia, Estomatologia, Endodontia, Periodontia, Ortodontia e Dentística. Esta terapia consiste na utilização do laser em baixa intensidade, com vistas à biomodulação da inflamação, reparação tecidual e analgesia.

O laser (do acrônimo *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*, ou Amplificação da Luz por Emissão Estimulada de Radiação) se caracteriza por uma fonte de radiação eletromagnética com características específicas, como monocromaticidade (todos os fótons tem o mesmo comprimento de onda), coerência temporal e espacial (as ondas dos fótons estão na mesma fase, no tempo e no espaço) e colimação (as ondas dos fótons que compõem o feixe se propagam de forma paralela), diferenciando o das demais fontes de luz.

O feixe laser é composto por fótons, partículas de energia que se propagam no espaço de forma ondulatória e são desprovidas de massa e carga.

Os fótons emitidos pelo laser interagem com os átomos e moléculas do tecido alvo, estes desencadeiam reações biológicas. Estas reações dependem do tipo de laser utilizado. De acordo com o efeito promovido pela irradiação laser, em fotodestruição, ou fotoativação tecidual (determinados pelo efeito fotoquímico, fototérmico e fotomecânico do laser) pode-se classificar a terapia laser em baixa ou alta intensidade.

Quando utilizado o laser em baixa intensidade, com densidade de potência entre alguns mW/cm^2 não se tem elevação de temperatura. Os efeitos fotofísicos, fotoquímicos e fotobiológicos, são responsáveis pela biomodulação, ou seja, pelo aumento ou diminuição da atividade metabólica da área irradiada.

Algumas funções celulares podem ser estimuladas quando o laser é empregado nos parâmetros adequados (Azevedo et al., 2006; Almeida-Lopes et al., 2001; Pereira et al., 2002; Marques et al., 2004). Sabe-se que o laser atua preferencialmente em células ou tecidos lesados, enfraquecidos, que estejam submetidos a um estresse oxidativo (Karu, 1989; Almeida-Lopes et al., 2001; Marques et al., 2004; Eduardo et al., 2008).

A biomodulação *in vitro* promovida pela LPT depende dos parâmetros de irradiação (Azevedo et al., 2006), tais como, comprimento de onda, densidade de potência e potência (Pereira et al., 2002). E ainda, dentro dos parâmetros adequados, o tecido pulpar não será lesado termicamente quando o aumento de temperatura for inferior a 5° C. Sicilia e colaboradores mencionaram que a aplicação do laser de diodo no comprimento de onda menor que 780 nm, com potência inferior a 30 mW, e com tempo de aplicação menor que 3 minutos, é segura para a polpa dentária (Sicilia et al., 2009).

Para que se tenha o efeito esperado, é necessário que ocorra absorção do laser pelos tecidos, mais especificamente pelas células. E esta se faz necessária para que haja conversão da energia luminosa do laser, em energia química para a célula. O que torna o processo de absorção possível é a presença de fotorreceptores (cromóforos - molécula ou átomo fotossensível) nas células, que são capazes de captar os fótons do laser. A faixa de emissão espectral ideal para que o processo de estimulação celular ocorra está entre o vermelho visível e o infravermelho próximo (de 660 a 830nm) (Karu, 1988).

Os mecanismos de ação do laser são iniciados no momento da irradiação (fotorrecepção) e se mantêm até que se atinja o efeito clínico (fotorresposta). Entre o início e fim deste processo, ocorre transdução e amplificação do sinal, denominadas de reações secundárias, ocorridas na ausência de luz.

No intuito de explicar os mecanismos de ação da LPT algumas hipóteses foram propostas, onde todas abordam os fotorreceptores como sendo o fator principal de reação (Karu, 1988; Smith, 1991; Karu, 1996; Karu, 1999; Vladimirov et al., 2004; Hamblin; Demidova-Rice, 2007).

Os efeitos biológicos são observados devido à absorção da radiação laser por algumas moléculas, e correspondem às reações celulares primárias, ou seja, reações induzidas diretamente pela luz (Kleblanov et al., 2001; Vladmirov et al., 2004).

Neste sentido, a primeira teoria foi elaborada por Karu, onde observou que a absorção do laser pelas flavinas (FADH e NADH) e citocromos da cadeia respiratória mitocondrial aumenta a formação de prótons na membrana das mitocôndrias, resultando na maior produção de ATP intracelular (Karu, 1989).

Smith propôs uma modificação no modelo de Karu, onde a radiação infravermelha, em um caminho adicional, pode ativar uma cascata de eventos, diretamente nos canais de cálcio (Ca^{+2}) da membrana celular através de modificações foto-físicas, induzindo a entrada de Ca^{+2} , que resulta na proliferação celular (Smith, 1991).

A enzima citocromo c oxidase, presente na mitocôndria, esta envolvida no processo metabólico ativado pela LPT (Karu, 1989; Karu, 1999; Vladmirov et al., 2004; Hamblin; Demidova-Rice, 2007). Esta enzima apresenta picos de absorção na região entre o vermelho e o infravermelho que são comuns ao espectro de ação dos efeitos da LPT.

Tem sido proposto que a LPT fotodissocia (fotodesliga) a ligação inibitória do óxido nítrico (NO) à citocromo c oxidase. Esta ligação ocorre quando as células encontram-se em situações de estresse, como por exemplo, em meio à lesão tecidual. Isso explicaria o aumento na produção de ATP e demais efeitos da laser fototerapia (Hamblin; Demidova-Rice, 2007).

Quando da ausência de luz, tem-se as reações secundárias do laser, que sinalizam a transdução e amplificação dos sinais inicialmente produzidos pelas reações primárias (Karu, 1999; Schindl et al., 2000).

A transdução do sinal e amplificação da maioria das fotorreações primárias, parece estar relacionada com as alterações de pH intracelular, promovidas pela ativação das ATPases, e alterações nos níveis de Ca^{+2} intracelular. Tem-se então uma mudança de estado redox para oxidação, com isso o aumento de Ca^{+2} intracelular intensifica o metabolismo celular. O aumento de Ca^{+2} estimula a síntese

de RNA, DNA, mitose celular e secreção de proteínas (Loevschall; Arenholt-Bindsley, 1994).

Juntas, as reações celulares primárias e secundárias produzidas pelo laser durante a LPT resultam nos efeitos de biomodulação da inflamação, aceleração na reparação tecidual e analgesia (Marques et al., 2010).

Frente a todos as teorias, e possíveis mecanismos de ação do laser, provavelmente, dois ou mais destes modelos podem atuar concomitantemente no tecido irradiado (Schindl et al., 2000; Marques et al., 2010).

A LPT tem demonstrado capacidade de modular o crescimento, a viabilidade celular e a diferenciação de tipos celulares como fibroblastos, osteoblastos e células endoteliais, entre outros. Estudos *in vitro*, utilizando cultura de células, tem demonstrado que a LPT pode acelerar o crescimento de tipos celulares como fibroblastos, osteoblastos e células endoteliais (Almeida-Lopes et al., 2001; Pereira et al., 2002; Marques et al., 2004; Azevedo et al., 2006; Fujihara et al., 2006; Eduardo et al., 2007), além de estimular a produção e secreção de proteínas e fatores de crescimento por estas células (Damante et al., 2009).

Em um estudo preliminar Eduardo e colaboradores mostraram que a LPT foi capaz de aumentar significativamente a proliferação celular das hDPSCs utilizando-se um laser no comprimento de onda vermelho (660nm) e densidade de energia de 3 J/cm² (Eduardo et al., 2008).

Estudos utilizando a LPT em células da polpa dentária humana verificaram um aumento na formação de nódulos de calcificação e na atividade da ALP (fosfatase alcalina) (Ohbayashi et al., 1999; Matsui et al., 2007). Em estudo realizado *in vivo* Utsunomiya observou a formação de ponte de dentina na superfície de polpas dentárias expostas de cães, uma semana após a irradiação com a LPT, tempo anterior ao grupo não irradiado (Utsunomiya, 1998).

O mecanismo de ação envolvido no processo de diferenciação das células da polpa dentária humana sobre efeito da LPT parece estar relacionado à ação do laser nos receptores de BMP-2 e na transdução do sinal desencadeado. Matsui e colaboradores verificaram que o laser aumentou a expressão de RNA mensageiro (mRNA), levando a um aumento na produção do fator de crescimento BMP-2.

Verificaram ainda, um aumento na formação de nódulos mineralizados através do ensaio de vermelho de Alizarina, e na produção de ALP nas células de polpa dentária irradiadas com GaAIs (Matsui et al., 2008).

Frente a todos os efeitos da LPT, a aplicação do laser no tratamento da HD tem sido recentemente proposta para o tratamento da HD. Para o tratamento da HD podem ser empregados os lasers de alta potência: Nd:YAG; Er:YAG; Er,Cr:YSGG; CO₂ (Kimura et al., 2000; Birang et al., 2007; Romano et al., 2011; Yilmaz et al., 2011a; Sgolastra et al., 2011; Sgolastra et al., 2013), ou ainda, os lasers de baixa potência: He-Ne, GaAIs (Aranha et al., 2009; Vieira et al., 2009; Orhan et al., 2011; Sgolastra et al., 2011; Yilmaz et al., 2011a; Yilmaz et al., 2011b; Lopes; Aranha, 2013; Sgolastra et al., 2013). O tratamento com a laser fototerapia no tratamento da HD tem apresentado bons resultados na literatura através de estudos *in vitro* e clínicos, além de estar consonante com os critérios propostos por Grossman (Kimura et al., 2000; Aranha, 2005; Aranha et al., 2009; Vieira et al., 2009; Orhan et al., 2011; Sgolastra et al., 2011; Yilmaz et al., 2011b; Sgolastra et al., 2013). Verificaram ainda, que esta modalidade de tratamento não apresenta efeitos adversos, quando utilizada nos parâmetros corretos (Orhan et al., 2011; Yilmaz et al., 2011 a; Sgolastra et al., 2013).

O mecanismo de ação dos lasers sobre o tratamento da HD ainda não está bem elucidado (Kimura et al., 2000; Aranha et al., 2009; Orhan et al., 2011; Sgolastra et al., 2011; Sgolastra et al., 2013). Neste sentido, algumas teorias tem sido propostas para explicar a ação do laser no tratamento da HD. Alguns autores tem mostrado que o laser de GaAIs age na transmissão neural nos túbulos dentinários (Corona et al., 2003), através da despolarização das fibras aferentes C, que culmina na analgesia promovida pela depressão da transmissão nervosa (Wakabayashi et al., 1993; Kimura et al., 2000; Sgolastra et al., 2011).

Foi sugerido ainda, que a laser fototerapia apresenta a capacidade de promover a fotobiomodulação, aumentando o metabolismo da atividade celular, mais especificamente dos odontoblastos, o que levaria ao aumento no depósito de dentina terciária pelos odontoblastos, obliterando os túbulos dentinários (Corona et al., 2003; Ladalardo et al., 2004). Estudo *in vivo* revelou que o laser foi capaz de

promover a biomodulação das células da polpa, resultando na indução da dentinogênese reacional (Ferreira et al., 2006).

Neste mesmo sentido, estudo realizado por Tate e colaboradores, utilizando laser de baixa potência (GaAlAs) em molares de ratos, verificaram através do ensaio de imuno-histoquímica a formação de uma camada de dentina terciária, comprovada pela imunorreação com a proteína HSP-25 (*heat-shock protein*) (Tate et al., 2006). Esta proteína é expressa durante o desenvolvimento dentário ou ainda, durante a diferenciação celular, sendo um marcador de odontoblastos, e quando em meio à presença de injúrias, como por exemplo, durante a execução de preparos cavitários sem parâmetros adequados, os odontoblastos perdem a imunoreatividade com a HSP-25. Mas também tem sido verificado que esta proteína é um importante marcador da diferenciação de células da polpa em odontoblastos após injúrias. Nesta situação caso os odontoblastos sobrevivam, estes poderão formar uma dentina do tipo reacional, mas se não sobreviverem, as células mesenquimais indiferenciadas da polpa podem ser recrutadas e se diferenciarem em odontoblastos-símile e produzir dentina do tipo reparativa (Tate et al., 2006; Harada et al., 2008) (Figura 2.2).

Também tem sido relatado que os lasers provocam coagulação das proteínas da matriz dentinária dentro dos túbulos, bloqueando a movimentação do fluido dentinário, e por consequência o estímulo doloroso (McCarthy et al., 1997; Miglani et al., 2010).

Uma recente revisão sistemática e meta-análise foi realizada com intuito de verificar a eficácia do laser de acordo com o tipo de laser, na redução da dor em casos de HD, quando comparada ao grupo placebo ou não tratamento (controle), e a verificação de efeitos adversos dessa modalidade de tratamento da HD (Sgolastra et al., 2013). Nesta revisão puderam concluir que o laser foi significativamente mais eficaz no tratamento da HD quando comparado ao placebo ou grupo não tratado, mostrando ainda que este tratamento não apresentou efeitos adversos, sendo uma forma eficaz e segura para o tratamento da HD. Contudo, novos estudos devem ser realizados com intuito de melhor explicar os mecanismos de ação do laser sobre as células da polpa em casos de HD. E ainda, não existe na literatura um parâmetro tido como padrão ouro (*gold standard*), uma vez que os estudos apresentam grande heterogeneidade.

OBJETIVO

3 OBJETIVO

Investigar os efeitos de substâncias liberadas por materiais utilizados no tratamento da HD (Gluma e Biovidro), associadas ou não à laser fototerapia (LPT), sobre a sobrevivência, proliferação e diferenciação de células mesenquimais indiferenciadas de polpa dentária humana.

MATERIAL E MÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODOS

Esta pesquisa foi elaborada em consonância com a lei nº 11.794 de 8 de outubro de 2008, inciso VII do § 1º do art. 225 da Constituição Federal. E foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, FOU SP, CAAE: 08818312.0.0000.0075 (ANEXO A).

4.1 Substâncias

O Gluma Desensitizer® (Heraeus, Hanau, Alemanha) se apresenta na forma de solução aquosa. Em sua fórmula contém 36% de hidroxietilmetacrilato (HEMA), cloreto de benzalcônio, 5% de glutaraldeído, flúor e água purificada (Figura 4.1 - a).

O Biovidro utilizado neste estudo foi desenvolvido pela Profa. Dra. Juliana Marchi no Departamento de Nanociência e de Materiais Avançados da Universidade Federal do ABC, UFABC (ANEXO B).

Foi utilizado um biovidro bioativo no sistema ternário SiO₂-CaO-P₂O₅, com a seguinte composição: 57% SiO₂, 26% CaO, 17% P₂O₅. (Figura 4.1 - b, e Figura 4.2).

Figura 4.1 – Materiais utilizados para condicionamento do meio de cultura, A - Gluma Desensitizer® (Heraeus); B - Biovidro

Figura 4. 2 – Eletromicrografias de varredura do biovidro após calcinação: aumento menor (a) e aumento maior (b)

4.2 Condicionamento dos Meios de Cultivo

Meio condicionado é aquele meio que retém substâncias liberadas por materiais para meio líquido (Freshney, 2010). Os meios condicionados utilizados neste estudo foram aqueles onde o meio de cultivo celular DMEM/Ham's F-12 (1:1, LGC Biotecnologia, Cotia, SP, Brasil) entrou em contato com o Gluma, bem como com o Biovidro. Esses meios condicionados foram obtidos seguindo a recomendação da American Society for Testing and Materials (ASTM, 1992). Foram utilizados 0,2 g de cada material para cada 1 mL de meio de cultura. Esse condicionamento teve a duração de 1 hora e foi realizado em estufa de CO₂ com atmosfera úmida e temperatura de 37° C. Os meios condicionados foram esterilizados com filtro de 0,22 µm (Corning, NY, EUA) (Figura 4.3).

Figura 4.3 - Tubos tipo Falcon contendo meio condicionado. A - Tubo contendo meio a ser condicionado pelo Biovidro; B - Condicionamento das substâncias por 1 hora, realizado em estufa de CO₂ com atmosfera úmida e temperatura de 37° C; C - Tubos contendo meio condicionado, à esquerda Biovidro, à direita Gluma

4.3 Cultivo Celular

Foram utilizadas células mesenquimais indiferenciadas de polpa dentária humana de dente decíduo, DD1 (Ferreira, 2011), pertencentes ao Laboratório de Pesquisas Básicas do Departamento de Dentística da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, FOU SP.

Alíquotas congeladas em nitrogênio líquido e crioprotegidas por dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma Chemical, St Louis, MO, EUA) de linhagem de DD1 foram descongeladas em banho de água a 37° C (Fanem, SP, Brasil) por dois minutos. Com a finalidade de remover o DMSO, as células foram adicionadas a um tubo tipo Falcon contendo 10 mL de meio fresco de cultivo DMEM/Ham's F-12 (1:1, LGC Biotecnologia, Cotia, SP, Brasil) suplementado com 15% de soro fetal bovino (SFB, Hyclone, Logan, Utah, EUA), 100 U/mL de penicilina (Invitrogen, Life Technologies Corporation, NY, EUA), 100 µg/mL de estreptomicina (Gibco, Life Technologies Corporation, NY, EUA), 2 mM de L-glutamina (Gibco) e 2 mM de aminoácidos não essenciais (Gibco) (Kerkis et al., 2006). O tubo contendo as células foi centrifugado a 300 g por 5 minutos, à temperatura ambiente (Centrífuga Excelsa Baby I modelo 206, Fanem, SP, Brasil), os sobrenadantes foram descartados e os corpos de fundo, precipitado de células, foram ressuspensos em 1 mL de meio de cultura fresco e transferidos para frascos de cultivo celular de 25 cm² de área cultivável (Corning) contendo 5 mL de meio fresco. Em seguida, foram incubados em estufa a 37° C em atmosfera úmida contendo 5 % de CO₂.

Todos os procedimentos de cultivo celular foram realizados em capela de fluxo laminar (Veco, Campinas, SP, Brasil), seguindo os protocolos para manutenção da esterilidade de materiais e soluções utilizadas (Freshney, 2010). O crescimento das células foi monitorado diariamente em microscópio de fase invertido (Nikon TMS, Nikon, EUA), e o meio trocado de acordo com o metabolismo celular.

Para manter as características de células indiferenciadas, as mesmas eram subcultivadas quando ocupavam aproximadamente 70 % da capacidade dos frascos de cultivo (70 % de confluência). Para isto o meio era reservado em um tubo tipo Falcon, resíduos de meio eram sugados, e a monocamada celular lavada com 2 mL

de solução tampão fosfato-salina (PBSA, LGC). A seguir, era aplicado sobre a monocamada 2 mL de tripsina a 0,25 % (Gibco), com a finalidade de desprender as células do frasco, e mantido durante 3 minutos em estufa a 37°C. O frasco de cultivo era levado ao microscópio para avaliar se as células haviam se desprendido. Para inativação da tripsina, o meio que havia sido reservado era aplicado sobre as células. O meio, que neste momento continha células e tripsina, era levado a um tubo tipo Falcon para centrifugação, seguindo o mesmo protocolo acima citado.

Após os subcultivos, uma alíquota de células era submetida ao processo de congelamento, que consiste na adição de 70% de meio, 10% de DMSO e 20% de SFB. Este processo de congelamento tinha por finalidade a manutenção da linhagem celular. Todos os experimentos foram realizados entre a quinta e nona passagem.

Para o ensaio de diferenciação celular através da observação de mineralização da matriz as células foram cultivadas em meio mineralizante, a saber:

O meio mineralizante foi preparado com meio de cultura DMEM F-12 (LGC), suplementado com 5% SFB (Hyclone), 50 mg/mL penicilina-estreptomicina-glutamina (PSG, Invitrogen), 50µg ácido ascórbico (Sigma), 1 mM β-glicerofosfato (Sigma), 10 nM dexametasona (Sigma).

4.4 Laser Fototerapia (LPT)

Para a realização da LPT foi utilizado um equipamento laser de diodo semi-condutor (Photon Lase III, DMC-Equipamentos, São Carlos, SP, Brasil) (Figura 4.4), os parâmetro utilizados (Ferreira, 2011) foram os seguintes: (Tabela 4.1).

Para verificar a saída de potência do equipamento, antes e após as irradiações, foi utilizado um medidor de potência, power meter (PowerMax, Coherent, EUA). Todos os procedimentos com o equipamento laser foram realizados seguindo todas as normas de segurança NBR/IEC 601.2.22 e IEC 60825-1/2001-8.

Tabela 4.1 – Parâmetros de irradiação para LPT

Parâmetros de irradiação para LPT	
Comprimento de onda (nm)	660
Meio ativo	InGaAlP
Área do feixe (cm ²)	0,028
Potência (mW)	20
Densidade de Potência (W/cm ²)	0,714
Densidade de energia (J/cm ²)	5
Tempo de irradiação por ponto (s)	7
Energia por ponto (J)	0,14
Modo de irradiação	Pontual e contato
Número de sessões (MTT)	2
Número de sessões (Vermelho de Alizarina)	4
Intervalo entre as sessões (h) (MTT)	6 h
Intervalo entre as sessões (h) (Vermelho de Alizarina)	48 h

As irradiações foram realizadas no modo pontual e em contato, posicionando-se a peça de mão do equipamento laser em contato com o fundo das placas de cultura celular, de forma perpendicular (Figura 4.5).

Para os experimentos onde as células foram plaqueadas em placas de 96 poços foi irradiado 1 ponto por poço (0,14 J de energia total), enquanto que para os

experimentos com placas de 48 poços, foram irradiados 2 pontos por poço (0, 28 J de energia total).

Figura 4.4 - Equipamento laser e display do laser de diodo semi-condutor (Photon Lase III, DMC-Equipamentos, São Carlos, SP, Brasil) mostrando os parâmetros utilizados

Para os ensaios de sobrevivência e o de proliferação celular as culturas foram irradiadas ou não por duas vezes (0,28 J de energia total), uma imediatamente após a aplicação do meio condicionado e outra 6 horas depois. Para o ensaio de diferenciação celular as culturas foram irradiadas por 4 vezes (1,2 J de energia total), uma imediatamente após a aplicação do meio condicionado e as demais em intervalos de 48 horas até 7 dias.

Figura 4.5 - Dispositivo para posicionamento do laser de forma perpendicular

4.5 Grupos Experimentais

Para a realização do presente estudo foram estabelecidos cinco grupos experimentais distribuídos da seguinte forma:

G1 – Controle: células cultivadas em condições ideais;

G2 – Gluma: células submetidas a meio condicionado pelo Gluma;

G3 – Biovidro: células submetidas a meio condicionado pelo Biovidro;

G4 – Gluma + LPT: células submetidas a meio condicionado pelo Gluma associado à LPT;

G5 – Biovidro + LPT: células submetidas a meio condicionado pelo Biovidro associado à LPT.

4.5.1 Ensaios Experimentais

Para o experimento de sobrevivência e o de proliferação celular as células foram plaqueadas ($1,5 \times 10^3$ células/poço) em placas de 96 poços (n=6) (Costar, Corning, NY, EUA). Os meios experimentais foram aplicados após 24 horas do plaqueamento, de acordo com os grupos experimentais. Após 24 horas da aplicação dos meios experimentais, realizou-se troca diária de metade do meio de cultivo por poço. Os dados de viabilidade celular foram obtidos no mínimo em triplicata.

Para o experimento de diferenciação celular as células foram plaqueadas (1×10^4 células/poço) em placas de 48 poços (n=3) (Costar). Após 24 horas do plaqueamento as culturas foram submetidas aos tratamentos de acordo com os grupos experimentais e mantidas em cultura por mais 21 dias, tendo metade do meio de cultura substituído a cada 48 horas, durante os primeiros 7 dias, e depois troca total de meio fresco a cada 2 dias.

4.5.1.1 Ensaio de redução do MTT

A viabilidade celular foi analisada através da mensuração da atividade mitocondrial das células com o ensaio da redução do MTT (3-(brometo de 4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio). Esse ensaio quantifica a conversão do MTT, que é solúvel em água, em um formazan insolúvel. O formazan, de cor azul purpúrea, é solubilizado e então, sua concentração é determinada pela densidade óptica em espectrofotômetro com filtro de 562 nm.

Para a análise do crescimento celular através do ensaio de redução do MTT, as células foram cultivadas em condições normais de nutrição e as culturas foram plaqueadas ($1,5 \times 10^3$ células por poço) em placas de cultivo de 96 poços (Figura 4.6).

Figura 4.6 - Grupos experimentais distribuídos em 2 placas de 96 poços, sendo uma para os grupos não irradiados, e outra para os grupos irradiados

Sobrevivência Celular

A análise de sobrevivência foi realizada no tempo de 24 horas após o contato com os meios experimentais. Os dados de MTT em densidade óptica foram transformados em porcentagem de viabilidade celular, considerando como 100% a viabilidade das células do grupo controle crescidas nas condições ideais de cultivo. Esta análise mostra a porcentagem de células que sobrevivem aos efeitos dos materiais dos diversos grupos.

Proliferação Celular

Para observação da capacidade proliferativa das células o ensaio de MTT foi realizado nos tempos de 24, 48 e 72 horas, após a aplicação dos meios condicionados de acordo com os grupos experimentais. Os dados em densidade óptica obtidos demonstram a permanência ou não da capacidade proliferativa das células que sobreviveram aos efeitos dos materiais dos diversos grupos.

Para a análise de sobrevivência celular em 24 horas, bem como da proliferação celular de 24 a 72 horas realizou-se o ensaio de redução do MTT. Para tanto foram preparados os reagentes A e B. O reagente A é composto por 0,05 g de MTT (Sigma) em 10 ml de PBSA e o reagente B, constituído por 1 g de SDS (dodecil sulfato de sódio; QBioGene, EUA) em 10 ml de 0,01 M de HCl (ácido clorídrico).

Os meios de cultura dos poços foram aspirados e substituídos por 100 µl de meio DMEM fresco. Foram adicionados 10 µl do reagente A em cada poço, incluindo os poços sem células, que serviram de controle negativo para a leitura no espectrofotômetro. Após 4 horas de incubação com o reagente A, em estufa a 37° C e protegido da luz com folha de papel alumínio, este foi removido e 100 µl do reagente B foi adicionado a cada poço. Essa solução foi gentilmente homogeneizada com ponteiros de 100 µl (Santa Cruz, Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, EUA) (Figura 4.7). Após 15 minutos foi realizada a leitura em espectrofotômetro Synergy HT Bio-Tek® (Bio-Tek®, Instruments, Inc. Winooski, Vermont, EUA) com filtro de 562 nm (Figura 4.8).

Figura 4.7 - Placa de 96 poços após a aplicação dos reagentes utilizados para o ensaio de MTT

Figura 4.8 - Leitor Elisa, espectrofotômetro Bio-Tek utilizado para leitura de absorbância das placas de 96 poços para o ensaio de MTT (Departamento de Biologia Oral, Bioquímica Oral, da Faculdade de Odontologia, FOU SP)

Os dados de absorbância foram utilizados para a obtenção das curvas de crescimento para as células cultivadas em condições normais de nutrição e em meios condicionados de acordo com o grupo experimental.

4.5.1.2 Ensaio de diferenciação celular

A análise da diferenciação celular se baseou na detecção da formação de matriz mineralizada. Para tanto, foram utilizadas imagens capturadas pela câmera digital para microscópio (Digital Sight DS-U3; DS-Fi 1; Nikon) das culturas celulares submetidas ao ensaio de vermelho de Alizarina. O vermelho de Alizarina cora áreas ricas em cálcio e é usado para visualizar precipitações de cálcio incorporadas na matriz (Pereira, 2009; Ferreira, 2011).

As células foram cultivadas em condições normais de nutrição e as culturas foram plaqueadas ($1,0 \times 10^4$ células por poço) em placas de cultivo de 48 poços (Figura 4.9).

Figura 4.9 - Grupos experimentais distribuídos em 2 placas de 48 poços, sendo uma para os grupos não irradiados, e outra para os grupos irradiados

Culturas confluentes de 21 dias foram submetidas ao Vermelho de Alizarina, para detecção de possíveis nódulos mineralizados (Figura 4.10).

Os poços foram lavados por duas vezes com 200 μ l 150 mM de cloreto de sódio (PBSA), as células aderidas foram fixadas em álcool a 50 % por 50 minutos a 4° C. A seguir, as amostras foram enxaguadas com água Mili Q. Os poços foram corados com 200 μ l de solução de Vermelho de Alizarina (alizarinred S, Sigma Aldrich, St Louis, EUA) a 1%, pH 4.2 por 55 minutos em temperatura ambiente, sob leve agitação. A solução de Vermelho de Alizarina foi aspirada, em seguida, as células foram lavadas três vezes com água destilada para remoção do excesso de corante, as placas foram mantidas semi-abertas até a secagem, quando então foram realizadas imagens de cada grupo experimental em máquina fotográfica acoplada ao microscópio, com aumento de 100x. O precipitado de cálcio presente foi corado em vermelho, revelando nódulos de mineralização.

Figura 4.10 – A - Vermelho de Alizarina; B - placa de 48 poços com a solução de Vermelho de Alizarina; C - incubação do Vermelho de Alizarina sob leve agitação em temperatura ambiente

4.6 Análise estatística

Os dados obtidos dos testes de sobrevivência (porcentagem de viabilidade celular) e o de proliferação celular (densidade óptica) foram comparados utilizando o teste ANOVA complementado pelo teste de Tukey. Foi considerado o nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$). Os testes foram realizados utilizando-se o Programa GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, CA, EUA).

RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 Ensaio de Sobrevivência Celular

A Figura 5.1 ilustra graficamente a porcentagem de viabilidade celular dos diferentes grupos experimentais no período de 24 horas após o contato com os meios experimentais. O grupo controle, considerado como 100%, apresentou viabilidade celular significativamente maior que as dos demais grupos ($p < 0,05$). Os grupos tratados com Gluma (G2 e G4) apresentaram viabilidades similares entre si e significativamente menores que as dos demais grupos ($p < 0,0001$). Os grupos tratados com o Biovidro (G3 e G5) apresentaram viabilidades celulares similares entre si.

Figura 5.1 - Ilustração gráfica das porcentagens de viabilidade celular dos diferentes grupos experimentais em 24 horas após contato com os meios experimentais. *Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes ao nível de 5%

5.2 Ensaio de Proliferação celular

No ensaio de redução do MTT realizado nos tempos experimentais de 24, 48 e 72 horas após o contato com os meios experimentais foram obtidas as curvas de crescimento celular para avaliar a capacidade proliferativa das culturas dos diferentes grupos experimentais. A quantidade de células foi obtida de forma indireta através dos dados de densidade óptica. A figura 5.2 ilustra este resultado. Crescimento significativo entre os períodos de 24 e 72 horas foi observado nos grupos G1 e G5. O número de células viáveis no grupo tratado com Gluma (G2) decresceu significativamente. Os grupos G3 e G4 mantiveram o número de células viáveis estável durante todo o período experimental.

Em 72 horas a quantidade de células no grupo controle (G1) foi significativamente maior que as dos demais grupos ($p < 0.0001$). Neste mesmo período os grupos tratados com Biovidro (G3 e G5) apresentaram número de células maiores que as dos grupos tratados com Gluma (G2 e G4) ($p < 0.0001$). O grupo tratado com Biovidro e irradiado (G5) apresentou número de células significativamente maior (< 0.0001) que a do grupo tratado com Biovidro, porém não irradiado (G3).

Figura 5.2 - Ilustração gráfica das curvas de crescimento celular dos diferentes grupos experimentais. Somente os grupos controle (G1) e o tratado com meios condicionados pelo Biovidro e LPT (G5) apresentaram crescimento celular significativo. †Maior que o número de células do mesmo grupo no tempo de 24 horas (< 0.0001). *Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos no tempo de 72 horas

5.3 Ensaio de Diferenciação Celular

A figura 5.3 apresenta ilustrativamente a distribuição das células nos poços de cultivo em microscopia de contraste de fase no período de 14 dias após o contato com os meios experimentais (lado esquerdo). No lado direito da figura 5.3 estão ilustradas as reações de coloração do vermelho de Alizarina no período de 21 dias após o contato das células com os meios experimentais em todos os grupos experimentais.

Em 14 dias era possível se observar confluência celular das culturas controle (G1) e aquelas tratadas com o Biovidro (G3 e G5). Essas células tinham aspecto fusiforme e formavam feixes (G1) ou apareciam com aspecto epitelióide (G3 e G5), sempre ocupando toda a área cultivável dos poços. Culturas tratadas com o Gluma apresentavam células esparsas e de formato fusiforme deixando aparecer o plástico de cultivo celular em vastas áreas dos poços (G2). As culturas tratadas com Gluma e irradiadas (G4) apresentavam aspecto mais poligonal e ocupavam maiores áreas dos poços, porém sem atingirem a confluência. (Figura 5.3 - lado esquerdo).

Os grupos controle (G1) e aqueles tratados com o Biovidro (G3 e G5) foram os que apresentaram grande quantidade de nódulos mineralizados de forma similar (Figura 5.3 – lado direito), enquanto as culturas tratadas com Gluma (G2 e G4) apresentaram escassos e pequenos nódulos de mineralização de forma inconsistente nos diversos poços analisados.

Figura 5.3 - Distribuição das células nos poços de cultivo de acordo com os grupos experimentais, observadas em microscopia de contraste de fase. Lado esquerdo corresponde ao período de 14 dias após o contato com os meios experimentais. Lado direito corresponde às reações de coloração do vermelho de Alizarina no período de 21 dias após o contato com os meios experimentais. Seta na figura de 14 dias do grupo Gluma + LPT indica a presença de divisão celular. Nos grupos Controle, Biovidro e Biovidro + LPT em 21 dias são observadas estruturas nodulares enegrecidas correspondentes a nódulos de mineralização (Aumento original de 100x).

14 dias- Microscopia de Fase

21 dias- Vermelho de Alizarina

Controle

Gluma

Biovidro

**Gluma
+
LPT**

**Biovidro
+
LPT**

6 DISCUSSÃO

Atualmente tem sido cada vez mais frequente a presença de indivíduos com lesões não cariosas (LCNC) (Järvinen et al., 1991; Levitch et al., 1994; Michael et al., 2010; Wood et al., 2008). Estas podem ser acompanhadas por hipersensibilidade dentinária (HD), decorrente da presença de túbulos dentinários expostos e abertos para o meio bucal, ficando estes suscetíveis a estímulos dolorosos (Addy, 1990; Holland et al., 1997; Dababneh et al., 1999; Kimura et al., 2000; Conceição et al., 2007; Curtis et al., 2010; Miglani et al., 2010; Yilmaz et al., 2011b). A maioria dos tratamentos existentes para a HD visam promover analgesia e obliteração dos túbulos dentinários, através do uso de agentes dessensibilizantes (Miglani et al., 2010). Porém, a maior parte desses tratamentos não são efetivos e duradouros (Kimura et al., 2000; Romano et al., 2011; Sgolastra et al., 2013). Tornando-se necessárias novas aplicações em um curto espaço de tempo.

Partindo-se do princípio que o material ideal para o tratamento da HD seria aquele que ocluísse externamente os túbulos, mesmo que de forma temporária, e que estimulasse a formação de dentina reparativa, que ocluísse estes túbulos em caráter duradouro, nos propusemos a investigar os efeitos de materiais utilizados no tratamento da HD com potencial ocludente e/ou bioestimulador, possivelmente capazes de induzir a formação de dentina. Assim, avaliamos os efeitos na sobrevivência, proliferação e diferenciação de células mesenquimais indiferenciadas da polpa dentária humana em resposta a substâncias liberadas por materiais utilizados no tratamento da HD (Gluma e Biovidro), associados ou não à laser fototerapia (LPT). Os resultados desta pesquisa mostraram que substâncias liberadas pelo Biovidro associadas à LPT foram capazes de incrementar significativamente o crescimento celular, e não interferiram na mineralização da matriz extracelular, fenômeno que indica diferenciação das células mesenquimais indiferenciadas da polpa dentária humana. Assim sendo, esta associação poderia ser de relevância para a obtenção de um tratamento com potencial duradouro da HD.

O Gluma Desensitizer[®] (Heraeus) é um agente dessensibilizante que tem mostrado resultados promissores em ensaios clínicos (Aranha et al., 2009; Yu et al.,

2010; Brahmabhatt et al., 2012; Lopes; Aranha, 2013). Este material promove a oclusão de túbulos dentinários, devido à presença do HEMA, que forma profundos tags, e do glutaraldeído que leva à coagulação de proteínas presentes nos túbulos dentinários, e à precipitação de albumina presente no fluido dentinário (Miglani et al., 2010).

Mais recentemente, um novo material bioativo, o Biovidro, foi introduzido para tratamento da HD (Forsback et al., 2004; Lee et al., 2007; Kuo et al., 2007; Curtis et al., 2010; Bakry et al., 2011a; Bakry et al., 2011b; Miglani et al., 2010). Este material apresenta algumas características que tornam esse biomaterial muito promissor, com vistas a uma Odontologia Regenerativa. E sua capacidade de reparar e regenerar partes do corpo humano apresenta um papel fundamental na medicina contemporânea, com um impacto crescente na sociedade moderna.

Sobre os efeitos dos Biovidros em Odontologia, verificou-se que este material promove a oclusão dos túbulos dentinários (Forsback et al., 2004; Lee et al., 2007; Miglani et al., 2010). Foi sugerido que o mecanismo de formação de cristais de cálcio-fosfato promovidos pelo biovidro 45S5 na superfície do dente ocorre uma vez que, íons fosfato libertados do biovidro 45S5 reagem com os íons de cálcio do biovidro e da dentina para formar sais de fosfato de cálcio. Estes sais inorgânicos são precipitados em cima da superfície da dentina, como pequenos cristais penetrando nos túbulos dentinários (Bakry et al., 2011b).

Os biovidros apresentam ainda, biocompatibilidade, induzem a migração, proliferação e diferenciação celular. A resposta biológica induzida por este biomaterial é determinada pela sua interação com as células, mediada por proteínas adsorvidas sobre a superfície do biomaterial (Cormack; Tilocca, 2012). Nossa pesquisa estudou um novo biovidro desenvolvido na UFABC que não havia sido biologicamente testado até o presente momento. Neste estudo este biovidro mostrou-se ser biocompatível. Observamos através do ensaio de sobrevivência celular em 24 horas, que os grupos tratados com meio condicionado por Biovidro (G3 e G5) apresentaram resultados significativamente melhores que os grupos tratados com Gluma (G2 e G4). E com o ensaio de proliferação celular em 72 horas observamos que os grupos tratados com meio condicionado por Biovidro (G3 e G5)

apresentaram número de células significativamente maiores que as dos grupos tratados com Gluma (G2 e G4).

Outra terapia utilizada nesta pesquisa foi a laser fototerapia (LPT) que tem sido utilizada no tratamento da HD. Diversos estudos foram realizados e comprovaram a sua eficácia como uma modalidade de tratamento promissor para a HD (Kimura et al., 2000; Ladalardo et al., 2004; Corona et al., 2003; Aranha et al., 2009; Vieira et al., 2009; Yilmaz et al., 2011a; Lopes; Aranha, 2013; Sgolastra et al., 2013).

Como se sabe a laser fototerapia (LPT) possui efeito biomodulador, no entanto, o exato mecanismo de ação dessa terapia sobre o tratamento da HD ainda não está muito bem elucidado. Alguns estudos vem sendo desenvolvidos com o intuito de melhor explicar o que acontece após a irradiação em condições de HD.

O tratamento com a LPT na HD apresenta um efeito clínico imediato, a analgesia, resultado da capacidade do laser de promover o bloqueio na transmissão nervosa. O laser age sobre a membrana celular, abrindo os canais de cálcio, e consequentemente aumento dos íons cálcio (Ca^{2+}), sódio (Na^{2+}) e potássio (K^+). Como resultado, o sistema de endorfinas e o potencial de ação das células neurais aumentam e, ao mesmo tempo, ocorre o bloqueio da despolarização das fibras C aferentes, não permitindo que a informação de dor chegue ao sistema nervoso central (SNC) (Wakabayashi et al., 1993; Kimura et al., 2000; Corona et al., 2003; Vieira et al., 2009; Sgolastra et al., 2011).

Além do efeito imediato no tratamento da HD, a LPT também apresenta um efeito clínico tardio, porém durador, que seria baseado na formação de dentina terciária promovida pela foto-biomodulação dos odontoblastos, resultando na obliteração dos túbulos dentinários (Kimura et al., 2000; Ladalardo et al., 2004; Corona et al., 2003; Tate et al., 2006). Este processo de formação de dentina terciária, promovida pela ação da laser fototerapia foi verificado em um estudo realizado por Tate e colaboradores. Neste estudo os autores observaram que houve a formação de dentina terciária em molares de ratos após irradiação com laser de GaAlAs, quando utilizado com potencia intermediária (1 W), já quando utilizaram potencia de 1.5 W observaram a formação de tecido osteodontogênico, podendo concluir que menores potencias são capazes de induzir a formação de dentina do

tipo terciária, e quando do uso de maiores potências tem-se a formação de tecido osteodontogênico (Tate et al., 2006).

Não existem na literatura estudos *in vitro* analisando os efeitos da associação da LPT com materiais com potencial dessensibilizante, como Gluma e Biovidro, sobre células mesenquimais indiferenciadas de polpa dentária humana na sobrevivência, proliferação e diferenciação celular. Sendo assim, este estudo foi delineado com intuito de responder essas questões importantes para o manejo clínico da HD.

Para tanto, este estudo utilizou a técnica de cultivo celular de células provenientes de polpa dentária humana. Esta técnica baseia-se na capacidade das células de se multiplicar em placa ou frasco de cultura em condições específicas, mantendo o máximo de suas características fisiológicas, bioquímicas e genéticas originais, uma vez que estas células se encontram fora do corpo humano.

Com o uso de substâncias que ocluem os túbulos dentinários abertos para o tratamento da HD, internamente nos túbulos, estas substâncias estarão em contato direto com o fluido dentinário e, portanto, sujeitas à solubilização neste fluido, que em última instância entrará em contato com as células pulpares. Isto porque, na prática clínica, estas substâncias não entram em contato direto com a polpa, mas sim em contato indireto através do fluido dentinário. Com o cultivo celular se pode mimetizar esta situação clínica *in vitro*, através do uso de meios condicionados pelos materiais com potencial dessensibilizante. Estes meios contêm as substâncias liberadas por estes materiais e podem ser colocados em contato com células plaqueadas. Assim, os dados obtidos através dessa investigação sobre a sobrevivência, proliferação e diferenciação celular, nos permite supor o que pode acontecer com a polpa dentária quando esta responde frente às substâncias liberadas por estes materiais.

A sobrevivência e proliferação celular foram acessadas através do ensaio de redução do MTT, que mostra a quantidade de células viáveis através da reação de redução do MTT (brometo de 3- (dimetiltiazol-2-yl)2,5-difeniltetrazólio). Esse teste quantifica a conversão do MTT, que é insolúvel em água, em um formazan solúvel. O formazan, de cor azul purpúrea, é solubilizado e então, sua concentração é determinada pela densidade óptica em espectrofotômetro com filtro de 562 nm. Com

isso se pode observar que todos os grupos experimentais apresentaram menor viabilidade celular que o controle (G1) ($p < 0,05$), onde as culturas de células foram crescidas em meio ideal. Porém, o grupo tratado com Biovidro seguido de irradiação (G5) foi o grupo em mais se aproximou do grupo controle (G1). Os grupos tratados com Gluma perderam a capacidade proliferativa, contudo, o grupo tratado com Gluma seguido de irradiação (G4) apresentou uma tendência na melhora da capacidade proliferativa. Essa tendência foi confirmada quando verificamos a fotomicrografia de fase em 14 dias, onde as culturas tratadas com Gluma e LPT apresentaram maiores áreas da placa cobertas com células, inclusive algumas em divisão, do que as culturas somente tratadas com Gluma.

Inicialmente as células foram cultivadas em condições ideais, quando passadas 24 horas do plaqueamento as células receberam os meios condicionados pelos materiais de acordo com os grupos experimentais. Esta situação provavelmente ocasionou um estresse a essas células. A ação do laser nas células que receberam os meios condicionados contendo substâncias liberados pelos materiais testados nesse estudo pode ser evidenciada no grupo tratado com Biovidro seguido de irradiação (G5) que apresentou incremento na proliferação celular. Isto pode ser justificado pela capacidade que a LPT apresenta de recuperar as funções celulares perdidas ou debilitadas (Corona et al., 2003). A LPT promove uma mudança no potencial elétrico da membrana celular, ativando as bombas de sódio (Na^+) e potássio (K^+), o que leva a um aumento da síntese de Trifosfato de Adenosina (ATP), por consequência, a biomodulação das células, observada pelo aumento na proliferação celular (Karu, 1989; Kimura et al., 2000).

Através da análise das imagens obtidas pelo contraste de fase no período de 14 dias foi possível verificar que os grupos controle (G1), grupo tratado com meio condicionado por Biovidro seguido de irradiação (G5) e grupo tratado com meio condicionado por Biovidro sem irradiação (G3) apresentavam confluência celular semelhante. O que pode ser justificado pela biocompatibilidade do material Biovidro frente às culturas celulares. Este achado é consonante com o encontrado em estudos *in vitro* onde avaliaram a biocompatibilidade do Biovidro em culturas de células (Kuo et al., 2007; Bakry et al., 2011b).

Neste mesmo período, as culturas tratadas com Gluma e não irradiadas (G2), apresentavam poucas células, sem atingirem confluência. Já as culturas tratadas com Gluma e irradiadas (G4) ocupavam maiores áreas dos poços, porém sem atingirem a confluência. Relacionando este achado com os resultados obtidos através do ensaio de proliferação celular, de fato não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos (G2 e G4), o que se pode observar foi uma tendência do laser na proteção celular, e com a análise das imagens pelo contraste de fase em 14 dias, esta tendência pode ser melhor observada, uma vez que as culturas celulares tratadas com Gluma seguida de irradiação (G4) ocupavam maiores áreas dos poços. Este resultado que mostra ser o Gluma um agente dessensibilizante que interfere na viabilidade e na proliferação celular, está de acordo com o encontrado na literatura. Outro estudo realizado no intuito de avaliar o efeito de agentes dessensibilizantes (Gluma Desensitizer, Seal&Protect e MicroPrime) na viabilidade e morfologia de fibroblastos, verificaram no tempo experimental de 48 horas que o crescimento celular foi inibido em todos os grupos experimentais, que pode ser observado pelo ensaio de MTT e análise morfológica (Sengun et al., 2006).

E ainda pode-se observar que o grupo tratado com Gluma (G2) apresentava no fundo da placa de cultivo restos celulares, sem a presença de células em divisão celular. Por outro lado, quando irradiado (G4), as células ainda tinham capacidade de se dividirem (Figura 5.3) e não foram observados restos celulares no fundo da placa de cultivo. Este achado pode ser um efeito tardio do laser, que fez com que algumas células ainda retivessem sua capacidade de proliferar, mesmo frente a um material que a princípio inibiu o crescimento celular.

Em 21 dias, após a coloração para o ensaio de Vermelho de Alizarina, os grupos controle (G1) e aqueles tratados com o Biovidro (G3 e G5) foram os grupos que apresentaram maior quantidade de nódulos mineralizados de forma similar. Enquanto que as culturas tratadas com Gluma (G2 e G4) apresentaram escassos e pequenos nódulos de mineralização de forma inconsistente nos diversos poços analisados. Com isto, podemos notar que os grupos tratados com Biovidro não interferiram na diferenciação, se mostrando semelhante ao grupo controle (G1). A diferenciação celular aconteceu nos grupos tratados com o Biovidro, associado ou não a LPT (G3 e G5). Podemos verificar com isto que as substâncias liberadas pelo

Biovidro não impediram a diferenciação celular. Já as substâncias liberadas pelo Gluma (G2 e G4) interferiram negativamente na diferenciação celular, impedindo que esta ocorresse. O Gluma seguido de irradiação pode ter melhorado a confluência celular, porém neste estudo não fizemos uma análise quantitativa da formação de nódulos mineralizados que nos permitisse confirmar esta hipótese. Apesar de não poder comparar a quantidade de diferenciação, o que se pode afirmar, é que a presença de nódulos mineralizados indica que houve diferenciação celular. Ou seja, a diferenciação celular foi observada nos grupos experimentais G1, G3 e G5.

Baseado na teoria hidrodinâmica de Brannström, o tratamento ideal da HD seria aquele que diminuísse a movimentação do fluido dentinário ou o bloqueio da resposta dos nervos pulpares. Mas ainda podemos acrescentar que este deve apresentar efeito durador, evitando recidivas, custos com tratamentos e retratamentos, e maiores desconfortos para o paciente. Contudo, a redução da HD só será possível quando da remoção dos agentes etiológicos.

Para tanto, frente às propriedades dos biovidros em ser biocompatível, induzir a migração, adesão, proliferação e diferenciação celular, e a associação com a LPT e sua capacidade de biomodulação e reparação tecidual, estas modalidades de tratamento associadas apresentam um grande potencial com vistas a um tratamento eficaz e duradouro.

Por muito tempo os avanços no desenvolvimento de materiais bioativos foram de natureza empírica, e agora se faz necessária uma maior compreensão dos mecanismos de bioatividade, ou seja, da resposta biológica diante do contato de substâncias liberadas por estes materiais no fluido dentinário, que repercutirão na resposta do tecido pulpar. Neste sentido, os resultados desta pesquisa nos permitiu verificar que as substâncias liberadas pelo Biovidro quando associada ao laser foram capazes de incrementar a proliferação celular, e ainda se teve a diferenciação celular, observada através da formação de nódulos de mineralização. Assim, em uma situação de HD, onde os túbulos estão abertos e expostos, e as células pulpares estão sofrendo constantemente, pela ação de ácidos provenientes de bebidas e alimentos e variações de pH no meio bucal, este biomaterial associado ao

laser seria capaz de manter as células da polpa mais viáveis e induzir a formação de dentina terciária (reacional ou reparativa).

Baseados nos resultados desta pesquisa *in vitro* estes nos permitem concluir que a LPT melhora a resposta de células mesenquimais indiferenciadas da polpa dentária humana ao Biovidro. Estas células sobrevivem, proliferam e se diferenciam, portanto, esta terapia de associação de biomaterial e laser fototerapia pode ser de relevância para futura aplicação no tratamento da HD, com possibilidade de resultar em um efeito duradouro. Portanto, estudos *in vivo* utilizando animais deverão ser realizados no sentido de testar os efeitos do Biovidro associado à LPT sobre dentina exposta que simulem situações clínicas de HD buscando analisar as respostas da polpa dentária.

CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

O presente estudo pode concluir que:

Substâncias liberadas pelo agente dessensibilizante Gluma são citotóxicas.

LPT atenua os efeitos citotóxicos do Gluma em longo prazo.

O Biovidro libera substâncias biocompatíveis que não interferem na diferenciação das células mesenquimais indiferenciadas da polpa dentária humana com formação de matriz mineralizada.

A LPT melhora a proliferação das células mesenquimais indiferenciadas em resposta a substâncias liberadas pelo Biovidro.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS¹

Addy M. Etiology and clinical implications of dentine hypersensitivity. *Dent Clin North Amer.* 1990;34:503–14.

Almeida-Lopes L, Rigau J, Zângaro RA, Guidugli-Neto J, Jaeger MM. Comparison of the low level laser therapy effects on cultured human gingival fibroblasts proliferation using different irradiance and same fluence. *Lasers Surg Med.* 2001;29(2):179-84.

American Society for Testing and Materials (ASTM). Annual Book of ASTM Standards Medical Devices. West Conshohocken: ASTM. 1992; 13(01): 172-6.

Anselme K. Osteoblast adhesion on biomaterials. *Biomaterials.* 2000 Apr;21(7):667-81.

Aranha ACC. Estudo *in vivo* da efetividade de diferentes métodos de dessensibilização dentinária em lesões cervicais não cariosas. [dissertação]. Piracicaba: Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba; 2003.

Aranha ACC. Avaliação dos efeitos do laser de Er/Cr:YSGG sobre superfícies radiculares expostas no tratamento da hipersensibilidade dentinária cervical: estudo *in vitro* e *in vitro*. [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2005.

Aranha AC, Pimenta LA, Marchi GM. Clinical evaluation of desensitizing treatments for cervical dentin hypersensitivity. *Braz Oral Res.* 2009 Jul-Sep;23(3):333-9.

Azevedo LH, de Paula Eduardo F, Moreira MS, de Paula Eduardo C, Marques MM. Influence of different power densities of LILT on cultured human fibroblast growth : a pilot study. *Lasers Med Sci.* 2006 Jul;21(2):86-9.

Baino F, Ferraris M, Bretcanu O, Verné E, Vitale-Brovarone C. Optimization of composition, structure and mechanical strength of bioactive 3-D glass-ceramic scaffolds for bone substitution. *J Biomater Appl.* 2013;27(7):872-90.

¹ De acordo com Estilo Vancouver.

Bakry AS, Takahashi H, Otsuki M, Yamashita K, Tagami J. CO₂ laser improves 45S5 bioglass interaction with dentin. J Dent Res 2011;90:246–50. a

Bakry AS, Tamura Y, Otsuki M, Kasugai S, Ohya K, Tagami J. Cytotoxicity of 45S5 bioglass paste used for dentine hypersensitivity treatment. J Dent. 2011;39(9):599-603. b

Bartlett DW, Shah P. A critical review of non-carious cervical (wear) lesions and the role of abfraction, erosion, and abrasion. J Dent Res. 2006 Apr;85(4):306-12.

Birang R, Poursamimi J, Gutknecht N, Lampert F, Mir M. Comparative evaluation of the effects of Nd:YAG and Er:YAG laser in dentin hypersensitivity treatment. Lasers Med Sci. 2007;22(1):21-4.

Blau HM, Brazelton TR, Weimann JM. The evolving concept of a stem cell: entity or function? Cell. 2001 Jun 29;105(7):829-41.

Brahmbhatt N, Bhavsar N, Sahayata V, Acharya A, Kshatriya P A double blind controlled trial comparing three treatment modalities for dentin hypersensitivity. Med Oral Patol Oral Cir Bucal. 2012 May 1;17(3):e483-90.

Brännstrom M, Astrom A. A Study on the mechanism of pain elicited from the dentin. J Dent Res. 1964;43:619–25.

Brink M. The influence of alkali and alkali earths on the working range for bioactive glasses. J Biomed Mater Res. 1997;36(1):109–17.

Brink M, Turunen T, Happonen R, Yli-Urppo A. Compositional dependence of bioactivity of glasses in the system Na₂O–K₂O–MgO–CaO–B₂O₃–P₂O₅–SiO₂. J Biomed Mater Res. 1997;37(1):114–21.

Busato ALS. Dentística: filosofia, conceitos e prática clínica. São Paulo: Artes Médicas; 2005.

Cate T. Histologia Oral: desenvolvimento, estrutura e função. 7^a. ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2008.

Conceição EM, Leite CV, Burnett Jr LH, Costa NP, Mezzomo E, Cueva MA, Soares CG, et al. Dentística; Saúde e Estética. 2^a ed. Porto Alegre: Artes Médicas; 2007.

Cordeiro MM, Dong Z, Kaneko T, Zhang Z, Miyazawa M, Shi S, Smith AJ, Nör JE. Dental pulp tissue engineering with stem cells from exfoliated deciduous teeth. *J Endod*. 2008 Aug;34(8):962-9.

Cormack AN, Tilocca A. Structure and biological activity of glasses and ceramics. *Philos Transact A Math Phys Eng Sci*. 2012;370(1963):1271-80.

Corona SA, Nascimento TN, Catirse AB, Lizarelli RF, Dinelli W, Palma-Dibb RG. Clinical evaluation of low-level laser therapy and fluoride varnish for treating cervical dentinal hypersensitivity. *J Oral Rehabil*. 2003;30:1183–9.

Cruz ACC, Silva JCZ, G L Pilatti, Santos F A. Use of bioactive glasses as bone graft substitutes – A review of literature. *Revista de Odontologia da Universidade Cidade de São Paulo*. 2006;18(3):287-95.

Curtis AR, West NX, Su B. Synthesis of nanobioglass and formation of apatite rods to occlude exposed dentine tubules and eliminate hypersensitivity. *Acta Biomater*. 2010;6(9):3740-6.

Dababneh R, Khouri A, Addy M. Dentine hypersensitivity: An enigma?. A review of terminology, epidemiology, mechanisms, aetiology and management. *Br Dent J*. 1999;187:606–11.

Damante CA, De Micheli G, Miyagi SP, Feist IS, Marques MM. Effect of laser phototherapy on the release of fibroblast growth factors by human gingival fibroblasts. *Lasers Med Sci*. 2009 Nov;24(6):885-91.

Descritores de Ciências da Saúde (DeCS); 2013 [citado em 23 de janeiro de 2013]. Disponível em: - <http://decs.bvs.br/cgi-bin/wxis1660.exe/decserver/>.

Dowell P, Addy M, Dummer P. Dentine Hypersensitivity.: aetiology, differential diagnosis and management. *Braz Dent J*. 1985 Feb;158(3):92-6.

Ducheyne P, Qiu Q. Bioactive ceramics: the effect of surface reactivity on bone formation and bone cell function. *Biomaterials*. 1999 Dec;20(23-24):2287-303.

Eduardo FP, Mehnert DU, Monezi TA, Zezell DM, Schubert MM, Eduardo CP, Marques MM. Cultured epithelial cells response to phototherapy with low intensity laser. *Lasers Surg Med*. 2007;39(4):365-72.

Eduardo FP, Bueno DF, Freitas PM, Marques MM, Passos-Bueno MR, Eduardo CP, Zatz M. Stem cell proliferation under low intensity laser irradiation: a preliminary study. *Lasers Surg Med*. 2008 Aug;40(6):433-8.

Ferraris MEG, Muñoz AC. *Histologia e embriologia bucodental*. 2a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2006.

Ferreira ANS, Silveira Jr L, Genovese WJ. Effect of GaAlAs laser on reactional dentinogenesis induction in human teeth. *Photomed Laser Surg*. 2006;24:358-65.

Ferreira LSF. Efeitos da fototerapia com laser em baixa intensidade e dos fatores de crescimento PDGF e BMP-2, isolados ou em associação, na diferenciação ósseo/odontogênica de células-tronco de polpa dentária humana. [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2011.

Forsback AP, Areva S, Salonen JI. Mineralization of dentin induced by treatment with bioactive glass S53P4 In vitro. *Acta Odontol Scand*. 2004;62:14-20.

Freshney RI. *Culture of animal cells: a manual of basic technique and specialized applications*. 6th ed. United States of America: Wiley-Blackwell; 2010.

Fujihara NA, Hiraki KR, Marques MM. Irradiation at 780 nm increases proliferation rate of osteoblasts independently of dexamethasone presence. *Lasers Surg Med*. 2006 Apr;38(4):332-6.

Galler KM, Hartgerink JD, Cavender AC, Schmalz G, D'Souza RN. A customized self-assembling peptide hydrogel for dental pulp tissue engineering. *Tissue Eng Part A*. 2012 Jan;18(1-2):176-84.

Garone Netto N, Russo EMA, Sobral MAP, Luz MAAC, Carvalho RCR. *Introdução à Dentística Restauradora*. 1ª ed. São Paulo: Editora Santos; 2003. v.1. 283p.

Garone Filho W, Silva VA. *Lesões não cariosas: o novo desafio da odontologia*. São Paulo: Editora Santos; 2008. 274p.

Gillam DG, Aris A, Bulman JS, Newman HN, Ley F. Dentine hypersensitivity in subjects recruited for clinical trials: clinical evaluation, prevalence and intra-oral distribution. *J Oral Rehabil*. 2002;29(3):226-31.

Goldberg M, Kulkarni AB, Young M, Boskey A. Dentin: structure, composition and mineralization. *Front Biosci.* 2011 Jan 1;3:711-35.

Grippio JO. Abfractions: a new classification of hard tissue lesions of teeth. *J Esthet Dent.* 1991 Jan-Feb;3(1):14-9.

Grossman LI. A systematic method for the treatment of hypersensitivity dentin. *JADA.* 1935;22:592-602.

Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 Dec 5;97(25):13625-30.

Hamblin MR, Demidova-Rice T. Cellular chromophores and signaling in low level light therapy. *SPIE.* 2007;6428:1-14.

Harada M, Kenmotsu S, Nakasone N, Nakakura-Ohshima K, Ohshima H. Cell dynamics in the pulpal healing process following cavity preparation in rat molars. *Histochem Cell Biol.* 2008 Oct;130(4):773-83.

Hench LL, Splinter RJ, Allen WC and Greenlee TK. Bonding Mechanisms at the interface of ceramic prosthetic materials. *J Biomed Mater Res.* 1972;2:117-14.

Hench LL. Bioceramics: from concept to clinic. *J Am Ceram Soc.* 1991;74(7) 1487-510.

Holland GR, Narhi MN, Addy M, Gangarosa L, Orchardson R. Guidelines for the design and conduct of clinical trials on dentine hypersensitivity. *J Clin Periodontol.* 1997;24:808–13.

Hu S, Chang J, Liu M, Ning C. Study on antibacterial effect of 45S5 Bioglass. *J Mater Sci Mater Med.* 2009;20(1):281-6.

Huan Z, Leeflang S, Zhou J, Zhai W, Chang J, Duszczak J. In vitro degradation behavior and bioactivity of magnesium-Bioglass(®) composites for orthopedic applications. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2011 [Epub ahead of print]

Ide M, Wilson RF, Ashley. The reproducibility of methods of assessment for cervical dentine hypersensitivity. *J Clin Periodontol.* 2001 Jan;28(1):16-22.

Irwin CR, McCusker P. Prevalence of dentine hypersensitivity in general dental population. *J Irish Dent Assoc.* 1997;43:7-9.

Ishihata H, Finger WJ, Kanehira M, Shimauchi H, Komatsu M. In vitro dentin permeability after application of Gluma® . as aqueous solution or aqueous fumed silica dispersion. *J Appl Oral Sci.* 2011 Apr;19(2):147-53.

Järvinen VK, Rytömaa II, Heinonen OP. Risk factors in dental erosion. *J Dent Res.* 1991 Jun;70(6):942-7.

Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, Reyes M, Lenvik T, Lund T, Blackstad M, Du J, Aldrich S, Lisberg A, Low WC, Largaespada DA, Verfaillie CM. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature.* 2002 Jul 4;418(6893):41-9.

Karu TI. Molecular mechanisms of therapeutic effect of low-intensity laser radiation. *Laser Life Sci.* 1988; 2:53-74.

Karu T. Photobiology of low-power laser effects. *Health Phys.* 1989 May;56(5):691-704.

Karu T. Mechanisms of interaction of monochromatic light with cells. In: Karu T, Young AR, eds. *Effects of low power light on biological systems.* Washington, DC: Proceedings of the European Society of Photo-Optical Instrumentation Engineers 1996;2630:2-9.

Karu T. Primary and secondary mechanisms of action of visible to near-IR radiation on cells. *J Photochem Photobiol B.* 1999 Mar;49(1):1-17.

Katchburian E. *Histologia e embriologia oral: texto-atlas-correlações clínicas.* 2a ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan; 2004.

Kerkis I, Kerkis A, Dozortsev D, Stukart-Parsons GC, Massironi SMG, Pereira LV, Caplan AI, Cerruti HF. Isolation and characterization of a population of immature dental pulp stem cells expressing OCT-4 and other embryonic stem cell markers. *Cells Tissue Organs.* 2006; 184:105-16.

Kimura Y, Wilder-Smith P, Yonaga K, Matsumoto K. Treatment of dentine hypersensitivity by lasers: A review. *J Clin Periodontol.* 2000;27(10):715-21.

Klebanov GI, Kreinina MV, Poltanov EA, Khristoforova TV, Vladimirov YA. Mechanism of therapeutic effect of low-intensity infrared laser radiation. *Bull Exp Biol Med.* 2001 Mar;131(3):239-41.

Kuo TC, Lee BS, Kang SH, Lin FH, Lin CP. Cytotoxicity of DP-bioglass paste used for treatment of dentin hypersensitivity. *J Endod.* 2007;33(4):451-4.

Ladalaro TC, Pinheiro A, Campos RA, Brugnera Júnior A, Zanin F, Albernaz PL, Weckx LL. Laser therapy in the treatment of dentine hypersensitivity. *Braz Dent J.* 2004;15(2):144-50.

Lee BS, Kang SH, Wang YL, Lin FH, Lin CP. In vitro study of dentinal tubule occlusion with sol-gel DP-bioglass for treatment of dentin hypersensitivity. *Dent Mater J.* 2007;26(1):52-61.

LeGeros RZ. Biodegradation and bioresorption of calcium phosphate ceramics. *Clin Mater.* 1993;14(1):65-88.

Levitch LC, Bader JD, Shugars DA, Heymann HO. Non-carious cervical lesions. *J Dent.* 1994 Aug;22(4):195-207.

Loevschall H, Arenholt-Bindslev D. Effect of low level diode laser irradiation of human oral mucosa fibroblasts in vitro. *Lasers Surg Med.* 1994;14(4):347-54.

Lopes AO, Aranha AC. Comparative evaluation of the effects of Nd:YAG laser and a desensitizer agent on the treatment of dentin hypersensitivity: a clinical study. *Photomed Laser Surg.* 2013 Mar;31(3):132-8.

Margonar R, Queiroz TP, Luvizuto ER, Marcantonio É, Lia RC, Holzhausen M, Marcantonio-Júnior É. Bioactive glass for alveolar ridge augmentation. *J Craniofac Surg.* 2012 May;23(3):e220-2.

Marques MM, Pereira AN, Fujihara NA, Nogueira FN, Eduardo CP. Effect of low-power laser irradiation on protein synthesis and ultrastructure of human gingival fibroblasts. *Lasers Surg Med.* 2004;34(3):260-5.

Marques MM, Meneguzzo DT, Simões A, Ramalho KM. Mecanismo de ação da fototerapia com laser em baixa intensidade (LPT). In: Eduardo CP. *Lasers em Odontologia*. 1a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2010.

Matsui S, Tsujimoto Y, Matsushima K. Stimulatory effects of hydroxyl radical generation by Ga-Al-As laser irradiation on mineralization ability of human dental pulp cells. *Biol Pharm Bull.* 2007 Jan;30(1):27-31.

Matsui S, Takeuchi H, Tsujimoto Y, Matsushima K. Effects of Smads and BMPs induced by Ga-Al-As laser irradiation on calcification ability of human dental pulp cells. *J Oral Sci.* 2008 Mar;50(1):75-81.

McCarthy D, Gillam DG, Parson DJ. In vitro effects of laser radiation on dentine surfaces. *J Dent Res.* 1997;76:233.

Michael JA, Kaidonis JA, Townsend GC. Non-carious cervical lesions on permanent anterior teeth: a new morphological classification. *Aust Dent J.* 2010 Jun;55(2):134-7.

Miglani S, Aggarwal V, Ahuja B. Dentin hypersensitivity: Recent trends in management. *J Conserv Dent.* 2010;13(4):218-24.

Miura M, Gronthos S, Zhao M, Lu B, Fisher LW, Robey PG, Shi S. SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 May 13;100(10):5807-12.

Nakashima M, Nagasawa H, Yamada Y, Reddi AH. Regulatory role of transforming growth factor-beta, bone morphogenetic protein-2, and protein-4 on gene expression of extracellular matrix proteins and differentiation of dental pulp cells. *Dev Biol.* 1994 Mar;162(1):18-28.

National Institutes Of Health (NIH). Stem cells: Scientific Progress and Future Research Directions; 2006. [citado: 26 de abril de 2013]. Disponível em: <http://stemcells.nih.gov/info/scireport/Pages/2006report.aspx>.

Ohbayashi E, Matsushima K, Hosoya S, Abiko Y, Yamazaki M. Stimulatory effect of laser irradiation on calcified nodule formation in human dental pulp fibroblasts. *J Endod.* 1999 Jan;25(1):30-3.

Orchardson R, Cadden SW. An update on the physiology of the dentine-pulp complex. *Dent Update.* 2001 May;28(4):200-6, 208-9.

Orchardson R, Gilliam D. Managing dentin hypersensitivity. *J Am Dent Assoc.* 2006;137:990-8.

Orhan K, Aksoy U, Can-Karabulut DC, Kalender A. Low-level laser therapy of dentin hypersensitivity: a short-term clinical trial. *Lasers Med Sci.* 2011;26(5):591-8.

Pashley HD. Dynamics of the pulpo-dentinal complex. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1996;7:104–33.

Peitl Filho O, LaTorre GP, Hench LL. Effect of crystallization on apatite-layer formation of bioactive glass 45S5. *J Biomed Mater Res.* 1996;30(4):509–14.

Pereira AN, Eduardo Cde P, Matson E, Marques MM. Effect of low-power laser irradiation on cell growth and procollagen synthesis of cultured fibroblasts. *Lasers Surg Med* 2002;31(4):263-7.

Pereira LB. Avaliação in vitro da biomodulação de células de linhagem odontoblástica (MDPC-23) de camundongos com laser de baixa potência [dissertação]. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto; 2009.

Poinern GE, Brundavanam RK, Mondinos N, Jiang ZT. Synthesis and characterisation of nanohydroxyapatite using an ultrasound assisted method. *Ultrason Sonochem.* 2009 Apr;16(4):469-74.

Romano AC, Aranha AC, da Silveira BL, Baldochi SL, Eduardo CP. Evaluation of carbon dioxide laser irradiation associated with calcium hydroxide in the treatment of dentinal hypersensitivity. A preliminary study. *Lasers Med Sci.* 2011;26(1):35-42.

Sakai VT, Zhang Z, Dong Z, Neiva KG, Machado MA, Shi S, Santos CF, Nör JE. SHED differentiate into functional odontoblasts and endothelium. *J Dent Res.* 2010 Aug;89(8):791-6.

Sauro S, Thompson I, Watson TF. Effects of common dental materials used in preventive or operative dentistry on dentin permeability and remineralization. *Oper Dent.* 2011;36(2):222-30.

Scaramucci T, Hara AT, Zero DT, Ferreira SS, Aoki IV, Sobral MA. Development of an orange juice surrogate for the study of dental erosion. *Braz Dent J.* 2011;22(6):473-8.

Scaramucci T, Sobral MA, Eckert GJ, Zero DT, Hara AT. In situ evaluation of the erosive potential of orange juice modified by food additives. *Caries Res.* 2012;46(1):55-61.

Schindl A, Schindl M, Pernerstorfer-Schön H, Schindl L. Low-intensity laser therapy: a review. *J Investig Med.* 2000 Sep;48(5):312-26.

Sengun A, Buyukbas S, Hakki SS. Cytotoxic effects of dental desensitizers on human gingival fibroblasts. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2006 Jul;78(1):131-7.

Sgolastra F, Petrucci A, Gatto R, Monaco A. Effectiveness of laser in dentinal hypersensitivity treatment: A systematic review. *J Endod.* 2011 Mar;37(3):297-303.

Sgolastra F, Petrucci A, Severino M, Gatto R, Monaco A. Lasers for the Treatment of Dentin Hypersensitivity: A Meta-analysis. *J Dent Res.* 2013 Apr 22. [Epub ahead of print]

Shiba H, Fujita T, Doi N, Nakamura S, Nakanishi K, Takemoto T, Hino T, Noshiro M, Kawamoto T, Kurihara H, Kato Y. Differential effects of various growth factors and cytokines on the syntheses of DNA, type I collagen, laminin, fibronectin, osteonectin/secreted protein, acidic and rich in cysteine (SPARC), and alkaline phosphatase by human pulp cells in culture. *J Cell Physiol.* 1998 Feb;174(2):194-205.

Sicilia A, Cuesta-Frechoso S, Suárez A, Angulo J, Pordomingo A, De Juan P. Immediate efficacy of diode laser application in the treatment of dentine hypersensitivity in periodontal maintenance patients: a randomized clinical trial. *J Clin Periodontol.* 2009 Aug;36(8):650-60.

Siqueira RL, Zanotto ED. Biosilicate[®]: historical of a highly bioactive brazilian glass-ceramic. *Quím Nova.* 2011;34(7):1231-1241.

Smith KC. The photobiological basis of low level laser irradiation therapy. *Laser Ther* 1991;3:19-24.

Smith AJ, Cassidy N, Perry H, Bègue-Kirn C, Ruch JV, Lesot H. Reactionary dentinogenesis. *Int J Dev Biol.* 1995 Feb;39(1):273-80.

Smith AJ, Lumley PJ, Tomson PL, Cooper PR. Dental regeneration and materials: a partnership. *Clin Oral Investig*. 2008 Jun;12(2):103-8.

Smith AJ, Smith JG, Shelton RM, Cooper PR. Harnessing the natural regenerative potential of the dental pulp. *Dent Clin North Am*. 2012 Jul;56(3):589-601.

Sobral MAP. Sensibilidade dentinária e lesões não cariosas. [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2010.

Sun ZL, Fang DN, Wu XY, Ritchie HH, Bègue-Kirn C, Wataha JC, Hanks CT, Butler WT. Expression of dentin sialoprotein (DSP) and other molecular determinants by a new cell line from dental papillae, MDPC-23. *Connect Tissue Res*. 1998;37(3-4):251-61.

Tate Y, Yoshida K, Yoshida N, Iwaku M, Okiji T, Ohshima H. Odontoblast responses to GaAlAs laser irradiation in rat molars: an experimental study using heatshock protein-25 immunohistochemistry. *Eur J Oral Sci*. 2006 Feb;114(1):50-7.

Tilocca A. Molecular dynamics simulations of a bioactive glass nanoparticle. *J Mater Chem* 2011;21: 12660-7.

Utsunomiya T. A histopathological study of the effects of low-power laser irradiation on wound healing of exposed dental pulp tissues in dogs, with special reference to lectins and collagens. *J Endod*. 1998 Mar;24(3):187-93.

Ulloa-Montoya F, Verfaillie CM, Hu WS. Culture systems for pluripotent stem cells. *J Biosci Bioeng*. 2005 Jul;100(1):12-27.

Vladimirov YA, Osipov AN, Klebanov GI. Photobiological principles of therapeutic applications of laser radiation. *Biochemistry (Mosc)*. 2004 Jan;69(1):81-90.

Van De Graaff KM, Anatomia Humana, 6^a ed. Barueri: Manole, 2003.

Vieira AH, Passos VF, de Assis JS, Mendonça JS, Santiago SL. Clinical evaluation of a 3% potassium oxalate gel and a GaAlAs laser for the treatment of dentinal hypersensitivity. *Photomed Laser Surg*. 2009;27(5):807-12.

Wakabayashi H, Hamba M, Matsumoto K, Tachibana H. Effect of irradiation by semiconductor laser on responses evoked in trigeminal caudal neurons by tooth pulp stimulation. *Lasers Surg Med*.1993;13(6):605–10.

Wagers AJ, Weissman IL. Plasticity of adult stem cells.*Cell*. 2004;116(5):639-48.

Wood I, Jawad Z, Paisley C, Brunton P. Non-carious cervical tooth surface loss: a literature review. *J Dent*. 2008 Oct;36(10):759-66.

Yilmaz HG, Kurtulmus-Yilmaz S, Cengiz E, Bayindir H, Aykac Y. Clinical evaluation of Er,Cr:YSGG and GaAlAs laser therapy for treating dentine hypersensitivity: A randomized controlled clinical trial. *J Dent*. 2011 Mar;39(3):249-54.a

Yilmaz HG, Kurtulmus-Yilmaz S, Cengiz. Long-term effect of diode laser irradiation compared to sodium fluoride varnish in the treatment of dentine hypersensitivity in periodontal maintenance patients: a randomized controlled clinical study. *Photomed Laser Surg*. 2011;29(11):721-5.b

Yu J, Wang Y, Deng Z, Tang L, Li Y, Shi J, Jin Y. Odontogenic capability: bone marrow stromal stem cells versus dental pulp stem cells. *Biol Cell*. 2007 Aug;99(8):465-74.

Yu X, Liang B, Jin X, Fu B, Hannig M. Comparative in vivo study on the desensitizing efficacy of dentin desensitizers and one-bottle self-etching adhesives. *Oper Dent*. 2010 May-Jun;35(3):279-86.

ANEXO A - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa consistirá na análise de agentes dessensibilizantes e laser em cultura de células originadas de polpa dental humana e estocadas no Laboratório de Pesquisas Básicas do Depto de Dentística, sendo que esta coleta foi previamente aprovada pelo CEP.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

A pesquisadora anexou uma autorização para que a aluna Talita Lopez utilize uma linhagem de células estocadas em seu laboratório. Além disso, a pesquisadora relata que o responsável pelo paciente doou o dente e assinou o TCLE aceitando que a linhagem possa ser utilizada em outros estudos sem necessidade de nova autorização. Esta linhagem foi estabelecida no projeto aprovado pelo CEP sob número CAAE: 03511012.5.0000.075.

Recomendações:

Nenhuma.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados ao CEP-FOUSP relatórios parciais anuais referentes ao andamento da pesquisa e relatório final ao término do trabalho. Qualquer modificação do projeto original deve ser apresentada a este CEP, de forma objetiva e com justificativas, para nova apreciação.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Aprovado.

SAO PAULO, 09 de Novembro de 2012

Assinador por:
Marcia Turolla Wanderley
(Coordenador)

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227
Bairro: Cidade Universitária CEP: 05.508-000
UF: SP Município: SAO PAULO
Telefone: (11)3091-7980 Fax: (11)3091-7814 E-mail: cepfo@usp.br

1 Síntese do Biovidro

Os vidros foram sintetizados através do método químico sol-gel. Tetraetilortosilicato (TEOS), nitrato de cálcio tetrahidratado ($\text{CaNO}_3\cdot 4\text{H}_2\text{O}$) e fosfato ácido de amônio ($(\text{NH}_4)\text{HPO}_4$) foram utilizados como precursores de vidros no sistema $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$.

Em um béquer com solução, composta por 120 ml de água deionizada e 40 ml de álcool, sob agitação constante, 7,8 g de TEOS foi hidrolisado e sua reação de hidrólise foi catalizada através da acidificação do meio com ácido nítrico 1 M até pH 2.0. Após a hidrólise completa do TEOS, nitrato de cálcio foi adicionado e dissolvido nesta solução. Em outro béquer, 12,5 g de polietilenoglicol (PEG) e 5,6 g de fosfato ácido de amônio foram dissolvidos em 1500 ml de água deionizada alcalinizada com solução de amônia à pH 10.0.

Sob agitação constante, a solução ácida foi gotejada na solução básica para realizar a reação de policondensação do TEOS, formando uma suspensão cerâmica com partículas amorfas, que permaneceu sob agitação durante 24 horas. Após a agitação, os vidros foram liofilizados e, posteriormente, calcinados em forno tipo mufla à 500° C/12horas para eliminação do PEG e de íons residuais.

2 Caracterização Física dos Vidros

2.1 Difração de Raio-X

Para a verificação da estrutura amorfa dos vidros após a calcinação, além de verificar possíveis cristalizações durante o processo, os vidros foram caracterizados por difração de raio-x. Neste equipamento é possível verificar padrões de difração de raio-x de materiais cristalinos, a ausência de padrões de difração em posições (ângulares) bem definidas define um material amorfo.

2.2 Microscopia Eletrônica de Varredura

A morfologia das partículas do pó obtido e seu estado de agregação foi observado através de microscopia eletrônica de varredura após a calcinação dos pós.

Resultados

Os resultados de difração de raio-X dos vidros após calcinação estão apresentados na Figura 1. Observa-se uma difração de raio-x típica de materiais amorfos, sem a presença de padrões de difração bem definidos, contendo apenas a presença de algumas bandas e um pico associados à ligações de estruturas de óxidos de silício (SiO_2), os quais possivelmente podem estar associados à um início de nucleação de cristais de sílica.

Figura 1 – Difratograma do Biovidro após calcinação

As fotomicrografias dos vidros após calcinação estão apresentadas na Figura 2. É possível observar a presença de partículas com tamanho entre 200 e 300 μm , na Figura 2a, e sobre suas superfícies a presença de partículas com tamanho entre 5 e 10 μm (Figura 2b). Este fato leva a hipótese de que as partículas maiores são compostas por agregados (partículas aglomeradas por interações ligações de Van der Waals) de partículas menores; a formação de agregados ocorre quando partículas micrométricas ou nanométricas têm sua área superficial reduzida, o que ocasiona a uma maior densidade de elétrons na superfície; esta maior densidade de elétrons favorece a formação de ligações de Van der Waals.

Figura 2 – Micrografias dos vidros após calcinação: aumento menor (a) e aumento maior (b)

ANEXO C – Testes Estatísticos

Sobrevivência Celular

Média e desvio padrão de viabilidade (%)

Viabilidade Celular (%)					
Tempo (h)	Grupos				
	G1	G2	G3	G4	G5
24	100 (0)	39,4 (10,2)	74,8 (11,7)	35,6 (8,3)	82,8 (12,3)
48	100 (0)	25,0 (5,1)	66,0 (7,9)	26,5 (6,5)	69,9 (4,7)
72	100 (0)	13,5 (3,2)	48,2 (6,2)	15,3 (1,3)	62,5 (7,3)

Proliferação Celular

Média e desvio padrão da proliferação celular em D.O

Densidade ótica					
Tempo (h)	Grupos				
	G1	G2	G3	G4	G5
24	0,33 (0,04)	0,13 (0,02)	0,24 (0,02)	0,12 (0,02)	0,27 (0,02)
48	0,40 (0,03)	1,10 (0,03)	0,27 (0,01)	0,11 (0,03)	0,28 (0,02)
72	0,60 (0,05)	0,07 (0,02)	0,27 (0,02)	0,09 (0,06)	0,40 (0,03)