

VICTHOR TEIXEIRA DE OLIVEIRA

**Envolvimento de substância P, osteopontina e
células gliais satélite na analgesia induzida por fotobiomodulação
em ratos submetidos a um modelo de hipersensibilidade dentinária**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Biologia de Sistemas do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

São Paulo
2020

VICTHOR TEIXEIRA DE OLIVEIRA

Envolvimento de substância P, osteopontina e células gliais satélite na analgesia induzida por fotobiomodulação em ratos submetidos a um modelo de hipersensibilidade dentinária

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Biologia de Sistemas do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Biologia Morfofuncional

Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Camila Squarzoni Dale

Versão final

São Paulo
2020

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Oliveira, Victhor

Envolvimento de substância P, osteopontina e células gliais satélite na analgesia induzida por fotobiomodulação em ratos submetidos a um modelo de hipersensibilidade dentinária / Victhor Oliveira; orientadora Camila Dale. -- São Paulo, 2020.
86 p.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Hipersensibilidade dentinária. 2. Fotobiomodulação. 3. Substância P. 4. Osteopontina. 5. Células gliais satélite. I. Dale, Camila, orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Vichthor Teixeira de Oliveira

Título da Dissertação: Envolvimento de substância P, osteopontina e células gliais satélite na analgesia induzida por fotobiomodulação em ratos submetidos a um modelo de hipersensibilidade dentinária

Orientador: Prof.(a) Dr.(a) Camila Squarzoni Dale

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou o(a) candidato(a):

() **Aprovado(a)** () **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Envolvimento de substância P, osteopontina e células gliais satélite na analgesia induzida por fotobiomodulação em ratos submetidos a um modelo de hipersensibilidade dentinária", protocolada sob o CEUA nº 5223250618, sob a responsabilidade de **Camila Squarzoni Dale e equipe; Victhor Teixeira de Oliveira** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo) (CEUA-ICB/USP) na reunião de 17/08/2018.

We certify that the proposal "Substance P, osteopontin and satellite glial cells involvement in photobiomodulation-induced analgesia in rats evaluated in a model of dentinal hypersensitivity", utilizing 128 Heterogenics rats (128 males), protocol number CEUA 5223250618, under the responsibility of **Camila Squarzoni Dale and team; Victhor Teixeira de Oliveira** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Biomedical Sciences Institute (University of São Paulo) (CEUA-ICB/USP) in the meeting of 08/17/2018.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa \(Acadêmica\)](#)

Vigência da Proposta: **36 meses**

Depto/Setor: [Anatomia](#)

Origem: [Biotério de Produção de Ratos da Rede de Biotérios da USP - Profa. Dra. Zuleica Bruno Fortes](#)

Espécie: [Ratos heterogênicos](#)

sexo: [Machos](#)

Idade ou peso: [250 a 370 g](#)

Linhagem: [Sprague Dowley](#)

N amostral: [128](#)

São Paulo, 10 de julho de 2020



Profa. Dra. Luciane Valéria Sita

Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo)



Dr. Alexandre Ceroni

Vice-Coodenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo)

Ilmo(a). Sr(a).
Responsável: Camila Squarzoni Dale
Área: Anatomia

Título da proposta: "Envolvimento de substância P, osteopontina e células gliais satélite na analgesia induzida por fotobiomodulação em ratos submetidos a um modelo de hipersensibilidade dentinária".

Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais ICB (ID 000241)

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo), no cumprimento das suas atribuições, analisou e **APROVOU** o Relatório Parcial (versão de 24/julho/2019) da proposta acima referenciada.

Resumo apresentado pelo pesquisador: "1. Qual o estágio do estudo no momento? Tendo o projeto um período vigente de 30 meses, o mesmo encontra-se com menos da metade da vigência, porém com bom desenvolvimento dos experimentos previstos, submetidos e aprovados pela CEUA no projeto de número 5223250618. Os resultados obtidos têm encaminhado de forma satisfatória o bom andamento do projeto. 2. O estudo, ou parte dele, já foi apresentado em congresso, publicado na forma de monografia, dissertação, tese e/ou periódico científico ou gerou alguma patente? Se afirmativo, anexar cópia da primeira página das publicações ou número de patentes derivadas do projeto aprovado pela CEUA. Sim. O projeto foi apresentado nos seguintes eventos: 1) IX Simpósio de Pós-graduação de Ciências Morfofuncionais USP realizado em outubro de 2018 e 2) IV Congresso de Dor Orofacial, São Paulo SP, realizado em abril de 2019. (Pôster em anexo). 3. Ocorreram problemas relativos ao uso de animais durante a execução do projeto? Em caso afirmativo, descreva o acontecimento e informe quais as providências tomadas para evitar que haja reincidência do problema. Não, não ocorreram problemas. 4. Algum aluno declarou escusa de consciência à experimentação animal, como previsto no artigo 39 da Lei Estadual nº 11.977/2005, durante a vigência do projeto? Em caso afirmativo, anexar documentação comprobatória do pedido e a atividade alternativa. Não, nenhum aluno declarou escusa de consciência. "

Comentário da CEUA: "".



Profa. Dra. Luciane Valéria Sita
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo)



Dr. Alexandre Ceroni
Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo)

Ilmo(a). Sr(a).
Responsável: Camila Squarzoni Dale
Área: Anatomia

Título da proposta: "Envolvimento de substância P, osteopontina e células gliais satélite na analgesia induzida por fotobiomodulação em ratos submetidos a um modelo de hipersensibilidade dentinária".

Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais ICB (ID 000616)

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo), no cumprimento das suas atribuições, analisou e **APROVOU** a Alteração do cadastro (versão de 17/fevereiro/2020) da proposta acima referenciada.

Resumo apresentado pelo pesquisador: "Durante o exame de qualificação realizado no dia 23.08.2019 foi sugerido a alteração do título do projeto, uma vez que o atual não citava a palavra "osteopontina". A palavra "astrócitos" foi substituída por "células gliais satélite", visto que, segundo a literatura, a última é a nomenclatura mais adequada."

Comentário da CEUA: "".



Profa. Dra. Luciane Valéria Sita
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo)



Dr. Alexandre Ceroni
Vice-Coodenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo)

São Paulo, 14 de julho de 2020
CEUA N 5223250618

Ilmo(a). Sr(a).
Responsável: Camila Squarzoni Dale
Área: Anatomia

Título da proposta: "Envolvimento de substância P, osteopontina e células gliais satélite na analgesia induzida por fotobiomodulação em ratos submetidos a um modelo de hipersensibilidade dentinária".

Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais ICB (ID 000832)

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo), no cumprimento das suas atribuições, analisou e **APROVOU** o Relatório Final (versão de 24/junho/2020) da proposta acima referenciada.

Resumo apresentado pelo pesquisador: "1. Os objetivos propostos foram cumpridos? Sim. 2. Todas as amostras obtidas foram utilizadas? Em caso negativo, informe quais amostras permanecem armazenadas. Não. 20 amostras foram coletadas e armazenadas com o intuito de aumento de n para envio de publicação. No entanto, ainda não foram utilizadas em razão da paralização das atividades no ICB pelo surto da COVID-19. 3. O estudo, ou parte dele, já foi apresentado em congresso, publicado na forma de monografia, dissertação, tese e/ou periódico científico ou gerou alguma patente? Se afirmativo, anexar cópia da primeira página das publicações ou número de patentes derivadas do projeto aprovado pela CEUA. Sim. 1) IX Simpósio de Pós-graduação de Ciências Morfofuncionais - USP, realizado em outubro de 2018, 2) IV Congresso de Dor Orofacial, São Paulo ? SP, realizado em abril de 2019. (pôster em anexo), 3) I Simpósio de Biologia de Sistemas - USP, realizado em outubro de 2019 (pôster em anexo) e 4) I Fórum On-line de Tecnologias de Luz na Saúde - Universidade Brasil, realizado em maio de 2020 (pôster em anexo). 4. Ocorreram problemas relativos ao uso de animais durante a execução do projeto? Em caso afirmativo, descreva o acontecimento e informe quais as providências tomadas para evitar que haja reincidência do problema. Não, não ocorreram problemas. 5. Algum aluno declarou escusa de consciência à experimentação animal, como previsto no artigo 39 da Lei Estadual nº 11.977/2005, durante a vigência do projeto? Em caso afirmativo, anexar documentação comprobatória do pedido e a atividade alternativa. Não, nenhum aluno declarou escusa de consciência. 6. O estudo envolve organismos geneticamente modificados? Anexar documentação comprobatória da extensão do Certificado de Qualidade em Biossegurança (CQB) para atividades de pesquisa em regime de contenção com OGM da classe de risco indicada na proposta, caso a documentação não tenha sido anexada na proposta original. Não. 7. Cite as principais conclusões obtidas com o projeto, destacando sua contribuição para a saúde, bem-estar humano/animal, melhoria da qualidade de vida ou melhoria do meio ambiente (máximo de 100 palavras). O tratamento com fotobiomodulação (660 nm e 808 nm) induz antinocicepção em ratos por mecanismos que envolvem diminuição da imunoreatividade de substância P, células gliais satélite e aumento da imunoreatividade osteopontina no modelo experimental de hipersensibilidade dentinária sem gerar efeitos adversos. Nossos dados garantem, comprovam e credibilizam a eficiência desta modalidade terapêutica em promover ação bioestimulatória acompanhada de efeitos antiinflamatórios, analgésicos e regenerativos. Efeitos esses indispensáveis, que garantem uma melhor qualidade de vida em pacientes que possuem hipersensibilidade dentinária."

Comentário da CEUA: "".



Profa. Dra. Luciane Valéria Sita
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo)



Dr. Alexandre Ceroni
Vice-Coodenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo)

Dedico esse trabalho à minha avó materna Neide Pereira Teixeira (em memória) que nunca mediu esforços pra investir na minha educação e crescimento pessoal. Obrigado (mesmo que de muito longe, mas dentro do meu coração) por continuar sendo a minha grande inspiração. Estou aqui honrando o seu nome e legado. Te amo eternamente!

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus e Nossa Senhora de Nazaré por sempre guiarem meus passos, me concedendo infinitas bênçãos e a sabedoria necessária para que fossem tomadas as melhores decisões durante todo este percurso.

À minha querida orientadora Prof.^a Dra. Camila Squarzoni Dale, a qual tenho um profundo respeito, admiração, gratidão e amor. Obrigado por me ensinar que a vida acadêmica vai muito além do que simplesmente realizar experimentos laboratoriais, qualificar, submeter um artigo científico e escrever uma dissertação. Mais importante do que tudo isso é o nosso amadurecimento pessoal e profissional nos tornando uma fonte de inspiração para outras pessoas. Obrigado por você ser a minha fonte de inspiração.

À Prof.^a Dra. Maria Luiza Morais Barreto de Chaves, que com muito carinho, me proporcionou viver uma experiência incrível participando da X Jornada de Anatomia da Universidade de São Paulo em 2018. Sou imensamente agradecido pela abertura de espaço, oportunidade e especialmente por ter sido o elo de ligação com a minha orientadora.

À minha coorientadora, Prof.^a Dra. Ana Cecilia Corrêa Aranha, a maior referência no campo da Laserterapia em Odontologia no Brasil, que com toda a sua excelência no assunto e profissionalismo impecável foi uma peça fundamental para a realização desse projeto. Obrigado pelo carinho, disponibilidade e por tantos ensinamentos.

À minha amada irmã, pela amizade, parceria e apoio incondicional em todas as escolhas difíceis e doloridas que precisei fazer pra chegar até aqui. Obrigado por estar sempre disponível para compartilhar minhas angústias, medos, inseguranças, alegrias e vitórias.

Aos meus pais pela educação, suporte emocional e financeiro. Obrigado por nunca desistirem de mim e por confiarem no meu potencial. Sem vocês tudo isso jamais seria possível.

À minha tia Lucimar Paixão de Oliveira e minha avó paterna Neide Paixão de Oliveira. Obrigado pelas orações, energias positivas, apoio emocional e financeiro, e acima de tudo, por acreditarem no meu potencial fazendo que eu me sinta tão especial todos os dias da minha vida.

Ao meu amigo e irmão de alma, Rodrigo Marques de Jesus, que sempre esteve ao meu lado me apoiando, me aconselhando e me instruindo. Gratidão infinita à Deus pelos nossos caminhos terem se cruzado, pois você é um dos presentes mais especiais que a vida me deu, um verdadeiro tesouro.

Aos meus colegas de laboratório que também são meus amigos e amigas que levarei comigo pro resto da vida: Victória Oliveira, Heloísa Matielo, João Ferrara, Elia Vedda, Giancarlo Giunti, Inaeh Oliveira, Elizamara Gonçalves, Beatriz Eng e Elaine Toniolo. Obrigado pela amizade, ideias, discussões, união, companheirismo, ajuda e acima de tudo pela ciência.

Ao meu grande amigo Paulo Henrique Amaro, alguém que tenho uma profunda admiração e extremo carinho. Obrigado pela amizade, parceria, fidelidade, encorajamento, paciência e infinitos conselhos.

Agradeço também ao querido técnico de laboratório Adilson da Silva Alves, um ser muito iluminado que com o seu jeito bem peculiar consegue conquistar a amizade, carinho e respeito de qualquer pessoa que cruze o seu caminho. Obrigado pelo extremo profissionalismo, ensinamentos e paciência.

Ao Prof. Dr. Luiz Roberto Giorgetti de Britto, por ceder seu laboratório e todos os equipamentos a ele pertencentes para a realização de parte dos experimentos que trouxeram excelentes resultados para este projeto. Obrigado por compartilhar um pouco do seu conhecimento brilhante na ciência e por me acolher no seu ambiente de trabalho.

Ao Prof. Dr. Edson Aparecido Liberti, que gentilmente concedeu-me a total liberdade para trabalhar no seu laboratório usando sua bancada de experimentos. Obrigado pela abertura de espaço.

Não poderia deixar de agradecer também aos técnicos de laboratório Martinha e Boleta, duas pessoas muito especiais dotadas de um profissionalismo impecável e muita experiência. Obrigado pelos ensinamentos, vocês são incríveis!

Agradeço a todo o corpo de funcionários do Instituto de Ciências Biomédicas que, diariamente, com muita ética, buscam manter em ordem e em excelente funcionamento os diversos setores dos departamentos. Obrigado!

À agência de fomento Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pela bolsa de mestrado concedida (88882.377357/2019-01), sendo este, o apoio financeiro fundamental para a execução desse projeto.

Por fim, mas não menos importante, gostaria de agradecer do fundo do meu coração e da minha integridade profissional à todos os ratos que deram as suas vidas gerando as amostras necessárias para alcançarmos todos os resultados. Obrigado por serem as grandes estrelas desse espetáculo.

*"A vida se torna uma festa quando sabemos
apreciar as delícias de cada dia."*

(Neide Pereira Teixeira)

RESUMO

OLIVEIRA, V.T. **Envolvimento de substância P, osteopontina e células gliais satélite na analgesia induzida por fotobiomodulação em ratos submetidos a um modelo de hipersensibilidade dentinária.** 2020. 86 f. Dissertação (Mestrado em Biologia de Sistemas) – Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

A hipersensibilidade dentinária (HD) é uma condição dolorosa resultante da exposição da dentina. As consequências deletérias variam de um simples desconforto sensorial que pode prejudicar a qualidade de vida do paciente e gerar distúrbios orais e sistêmicos. A terapia de fotobiomodulação (FBM) tem sido amplamente utilizada como tratamento complementar em pacientes com dor orofacial aguda e crônica, principalmente devido aos seus efeitos analgésicos, anti-inflamatórios e regenerativos. Aqui avaliamos alguns dos mecanismos moleculares envolvidos no efeito antinociceptivo induzido pela FBM em um modelo experimental de HD em ratos, induzido por exposição crônica à solução isotônica (S.I). Ratos machos Sprague Dawley (250-370 g) foram utilizados ao longo deste estudo. A HD foi induzida por erosão dentária promovida pela ingestão diária de S.I (sabor a limão, pH 2,87) por 45 dias. FBM (vermelho 660 nm ou infravermelho 808 nm) (1J, 3,6 J / cm², 100 mW, 10 s, 0,28 cm²) foi usada nos experimentos em frequência contínua. A avaliação nociceptiva demonstrou uma diminuição na sensibilidade a dor de ratos consistente com HD. O tratamento com FBM induziu antinocicepção em todos os períodos avaliados. Esse efeito foi acompanhado por uma diminuição da substância P (SP) (P <0,0001) e proteína glial fibrilar ácida (GFAP) (P <0,0001) no gânglio trigêmeo (TG), bem como aumento do osteopontina (OPN) e diminuição SP no complexo dentino pulpar de maneira significativa. Os dados aqui obtidos reforçam o potencial terapêutico da terapia de FBM no tratamento da HD.

Palavras-chave: Hipersensibilidade dentinária. Fotobiomodulação. Substância P. Osteopontina. Células gliais satélite.

ABSTRACT

OLIVEIRA, V.T. **Envolvimento de substância P, osteopontina e células gliais satélite na analgesia induzida por fotobiomodulação em ratos submetidos a um modelo de hipersensibilidade dentinária.** 2020. 86 f. Dissertação (Mestrado em Biologia de Sistemas) – Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

Dentin hypersensitivity (DH) is a painful condition resulting from dentin exposure. The deleterious consequences range from simple sensory discomfort that, can impair the patient's quality of life as well as to generate oral and systemic disorders. Photobiomodulation therapy (PBM), has been widely used as a complementary treatment in patients with acute and chronic orofacial pain, mainly due to its analgesic, anti-inflammatory and regenerative effects. Herein we evaluated some of the molecular mechanisms involved on PBM-induced antinociceptive effect in an experimental model of DH in rats, induced by chronic exposure to isotonic solution (I.S). Male Sprague Dawley rats (250-370 g) were used throughout this study. DH was induced by dental erosion promoted by daily ingestion of I.S (lemon flavor, pH 2.87) for 45 days. PBM (red 660 nm or infrared 808 nm) (1J, 3.6 J / cm², 100 mW, 10 s, 0.28 cm²) was used through the experiments in a continuous frequency. Nociceptive evaluation demonstrated a decrease on pain sensitivity of rats consistent with DH. PBM treatment induced antinociception in all evaluated periods. This effect was accompanied by an decrease of substance P (SP) ($P<0.0001$) and glial fibrillary acidic protein (GFAP) ($P<0.0001$) on the trigeminal ganglion (TG), as well as increase of osteopontin (OPN) and decrease SP on the dentin pulp complex significantly. Data obtained herein reinforce the therapeutic potential of PBM therapy in the treatment of DH.

Keywords: Dentin hypersensitivity. Photobiomodulation. Substance P. Osteopontin. Glial satellite cells.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Delineamento experimental do protocolo de indução da HD e tratamento com FBM	50
Figura 2 - Fotomicrografia representativa de imuno-histoquímica da junção dentino-polpa (JDP) e polpa (P) contracolorados com hematoxilina	56
Figura 3 - Fotomicrografia representativa de imuno-histoquímica da junção dentino-polpa (JDP) e polpa (P) contracolorados com hematoxilina	58
Figura 4 - Fotomicrografia representativa de imuno-histoquímica das células neuronais (CN) no interior do GT	60
Figura 5 - Fotomicrografia representativa de imuno-histoquímica das células neuronais (CN) no interior do GT	62

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Avaliação do efeito antinociceptivo da FBM frente ao teste de sensibilidade térmica ao frio	54
Gráfico 2 - Análise imuno-histoquímica de SP em molares em 72h	55
Gráfico 3 - Análise imuno-histoquímica de OPN em molares ao 14º dia	57
Gráfico 4 - Análise imuno-histoquímica de SP em GT em 72h	59
Gráfico 5 - Análise imuno-histoquímica de GFAP em GT em 72h	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Descrição do comportamento frente ao estímulo térmico	49
Tabela 2 - Parâmetros utilizados no tratamento de FBM vermelho e infravermelho	51

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

[Ca (OH) 2] - hidróxido de cálcio

TGF- β - fator de transformação do crescimento beta

AMPC - AMP cíclico

ASICs - canais iônicos sensíveis a ácidos

ATM - articulação temporomandibular

A δ - a-Delta

CCO - citocromo c oxidase

O₂ - oxigênio

H₂O - água

CGRP - peptídeo relacionado ao gene da calcitonina

CGS - células glias satélite

CN - células neuronais

H₂O₂ - peróxido de hidrogênio

ANOVA - análise de variância

CNSTE - complexo nuclear sensorial do tronco encefálico

COX-2 - ciclo-oxigenase 2)

CRDM - Corno da Raiz Dorsal Medular (verificar)

CT - controle

AHT - avaliação de hipersensibilidade térmica

h - horas

D - dentina

DH - dentinal Hypersensitivity

DP - dentina primária

DRea - dentina reacionária

DRep - dentina reparadora

DS - dentina secundária

DT - dentina terciária

FBM - fotobiomodulação

g - gramas

GABA - ácido gama-aminobutírico

GFAP - proteína glial fibrilar ácida/glial fibrillary acidic protein

GT - gânglio trigeminal

HD - hipersensibilidade dentinária

He-Ne - hélio-neônio

GaAlAs - arseneto de gálio e alumínio

Nd : YAG - neodímio: ítrio-alumínio-granada

CO₂ - dióxido de carbono

Er: YAG - érbio: ítrio-alumínio-granada

Er - Cr: YSGG - érbio-cromo: ítrio-escândio-gálio-granada

IL - 1 β - interleucina 1 beta

TNF α - fator de necrose tumoral alfa

ATP - adenosina trifosfato

NO - óxido nítrico

IL-1 - interleucina 1

IL-6 - interleucina 6

JDP - junção dentino-pulpar

K⁺ - potássio

KO - knockout

MEC - matriz extracelular

mg/kg - miligramas por quilo

PB - tampão fosfato

EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético

M - molar [molaridade]

min - minutos

DAB - diaminobenzidina

μm^2 - micrômetros quadrados

Na⁺ - sódio

NK1- neuroquinina 1

NK2 - neuroquinina 2

NK3 - neuroquinina 3

nm - nanômetros)

ml - mililitros

S.I - solução isotônica

S.I + FBM 660 nm - solução isotônica mais fotobiomodulação de 660 nanômetros

OPN - osteopontina/osteopontin

P - polpa

P1MD - proteína 1 da matriz dentinária

PAG - substância cinza periaquedutal

PBM - photobiomodulation

PGE2 - prostaglandina E2)

pH - potencial hidrogeniônico

PNCs - proteínas não-colágenas

RNAm - ácido ribonucleico mensageiro

S.I + FBM 808 nm - solução isotônica mais fotobiomodulação de 808 nanômetros

SIBLING - glicoproteínas N-ligadas

SLD - sialoproteína dentinária

RGD - motivo arg - gly – asp

SNC - sistema nervoso central

SP - substância P/substance P

SPO - sialoproteína óssea

SPPD - sialofosfoproteína dentinária

TG - trigeminal ganglion

TNF - fator de necrose tumoral)

TRPs - canais de potenciais receptores de transientes

VR1 - receptor vanilóide 1

LISTA DE SÍMBOLOS

© - copyright

< - menor que

> - maior que

°C - grau celsius)

α - alfa

β - beta

δ - delta

% - porcentagem

μm - micrômetro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	25
1.1 <i>Dor e seus mecanismos</i>	25
1.2 <i>Hipersensibilidade dentinária (HD) - O problema</i>	39
1.3 <i>HD - Fisiologia do complexo dentino-pulpar e mecanismos moleculares relacionados</i>	40
1.4 <i>HD - Diagnóstico e tratamento</i>	43
1.5 <i>Fotobiomodulação (FBM)</i>	44
2 JUSTIFICATIVA	46
3 OBJETIVOS	47
3.1 <i>Objetivos específicos</i>	47
4 MATERIAIS E MÉTODOS	48
4.1 <i>Indução da hipersensibilidade em dentes de rato</i>	48
4.2 <i>Avaliação da hipersensibilidade térmica (ATH)</i>	48
4.3 <i>Tratamento com FBM</i>	50
4.4 <i>Imuno-histoquímica</i>	51
4.5 <i>Análise quantitativa</i>	53
4.6 <i>Análise estatística</i>	53
5 RESULTADOS	54
5.1 <i>Efeito do tratamento com FBM sobre a HD de ratos avaliados em modelo de nocicepção térmica</i>	54
5.2 <i>Efeito do tratamento com FBM (vermelho e infravermelho) na imunoreatividade de SP em molares de ratos avaliado por imuno-histoquímica</i>	55
5.3 <i>Efeito do tratamento com FBM (vermelho e infravermelho) na imunoreatividade de OPN em molares de ratos avaliado por imuno-histoquímica</i>	57
5.4 <i>Efeito do tratamento com FBM (vermelho e infravermelho) na imunoreatividade de SP em GT de ratos avaliado por imuno-histoquímica</i>	58
5.5 <i>Efeito do tratamento com FBM (vermelho e infravermelho) na imunoreatividade de GFAP em GT de ratos avaliado por imuno-histoquímica</i>	60
6 DISCUSSÃO	62

7 CONCLUSÕES	70
8 REFERÊNCIAS	71

1 INTRODUÇÃO

1.1 *Dor e seus mecanismos*

A dor em geral e a hipersensibilidade dentinária (HD) são especificamente experiências pessoais e complexas sendo impossível compartilhar plenamente com os outros, tornando a quantificação um verdadeiro desafio (BRÖNNIMANN, BEN VE et al., 2019). Os conceitos mais recentes apontam que a experiência dolorosa está associada com dano tecidual ou potencial com componentes sensoriais, emocionais, cognitivos e sociais (WILLIAMS, AMANDA C. DE C.; CRAIG, KENNETH D., 2016), constituindo-se em precoce dispositivo de advertência para proteger o corpo de eventuais injúrias teciduais, além de contribuir na reparação após dano através da indução da hipersensibilidade a estímulos normalmente inócuos, no entanto pode se tornar uma doença quando persiste e é recorrente há mais de três meses, ficando crônica e desprovida de qualquer função biológica. É alicerçada em uma complexa experiência que não envolve somente a transdução de estímulos ambientais nocivos, mas também a análise cognitiva e resposta emocional pelo sistema nervoso central.

A própria reorganização e remodelação estrutural dos mecanismos nociceptivos representam um grande desafio e uma excitante área de avanço na compreensão da dor (JULIUS, DAVID, BASBAUM, ALLAN I., 2001; KUNER, ROHINI; FLOR, HERTA., 2017; WILLIAMS, AMANDA C. DE C.; CRAIG, KENNETH D., 2016). A percepção da dor é subjetiva e é influenciada por muitos fatores. Um estímulo sensorial idêntico pode induzir respostas bastante distintas no mesmo indivíduo sob condições diferentes. Muitos soldados feridos, por exemplo, não sentem dor até que tenham sido removidos do campo de batalha; atletas lesionados com frequência não têm conhecimento da dor até o jogo terminar. Assim, não há um estímulo puramente “doloroso”, um estímulo sensorial que invariavelmente cause percepção de dor em todos os indivíduos (KANDEL, ERIC et al., 2014).

A dor pode ser dividida em categorias distintas, assim compreendidas: fisiológica ou nociceptiva, inflamatória e neuropática. A dor fisiológica tem função de alerta e é um sinal característico dos mecanismos de proteção do organismo contra dano tecidual. A dor inflamatória é gerada pela estimulação inespecífica da inervação sensitiva e pela ação de mediadores químicos liberados durante o processo inflamatório. Já a dor

neuropática se distingue da dor aguda principalmente devido à existência de plasticidade neuronal no processo de percepção de dor, sendo resultante de lesões no sistema nervoso periférico, medula espinal e/ou encéfalo, as quais induzem sensibilização central e periférica, levando a alodinia (dor em resposta a estímulos não lesivos), dor espontânea e hiperalgesia (dor exagerada em resposta a estímulos lesivos) (SCHAIBLE, HANS-GEORG, RICHTER, FRANK., 2004).

Nociceptores são terminações nervosas livres que funcionam como receptores localizados nos tecidos, sendo estes ativados especificamente por estímulos dolorosos. Tal informação é transduzida por eles e, em seguida, transformada em um sinal elétrico, sendo por fim, transmitida da periferia até o sistema nervoso central (SNC) pelos axônios (STEEDS, CHARLOTTE E., 2016).

Existem dois tipos de nociceptores: 1) mecanoreceptores de alto limiar que respondem a deformações mecânicas e 2) nociceptores polimodais, que são sensibilizados pela presença de mediadores químicos produzidos em consequência de uma lesão tecidual. As fibras A- δ e C são os principais representantes desta última classe de nociceptores. Seus aferentes primários (neurônios de primeira ordem) têm seus corpos celulares localizados na coluna posterior da medula espinal, local este onde ocorre a sinapse com os aferentes secundários (neurônios de segunda ordem). É importante salientar que neste local ocorre também interações complexas entre interneurônios excitatórios e inibitórios e onde os tratos inibitórios descendentes de centros superiores exercem seus efeitos (STEEDS, CHARLOTTE E., 2016).

Os neurônios de segunda ordem ascendem para centros superiores via tratos contralaterais espinotalâmico e espinoreticular (localizados na região anterolateral branca da medula espinal). O tálamo é a área chave no processamento da informação somatossensorial, pois os axônios que viajam ao longo do trato espinotalâmico medial e lateral fazem sinapse com aferentes terciários (neurônios de terceira ordem) para que estes, então, se projetem para áreas primárias e secundárias do córtex somatossensorial, insula, córtex cingulado anterior e córtex pré-frontal. Estas áreas exercem funções de suma importância na percepção da dor e também interagem com outras áreas do cérebro (cerebelo e núcleos da base) (STEEDS, CHARLOTTE E., 2016).

A via descendente tem um papel fundamental na modulação da dor, visto que existem duas áreas importantes envolvidas nesse contexto: substância cinzenta periaquedutal (PAG) e núcleo magno da rafe. A PAG recebe informações vindas do tálamo, hipotálamo e córtex, assim como colaterais provenientes do trato espinotalâmico. Os neurônios PAG (também chamados de anti-nociceptores) vão excitar as células do núcleo magno da rafe que, por sua vez, se projetam para bloquear a transmissão da dor pelas células da coluna posterior da medula espinal (STEEDS, CHARLOTTE E., 2016).

A região orofacial compreende a uma variedade de tecidos e estruturas incluindo face, meninges, mucosa oral, dentes e periodonto, periósteo, ossos, articulação temporomandibular (ATM), músculos, ligamentos, fâscias, etc. (CHICHORRO, JULIANA GEREMIAS, PORRECA, FRANK, SESSLE, BARRY, 2017).

A face e a cavidade oral possuem uma grande importância atrelada a funções fisiológicas (mastigação, deglutição, fala e expressão das emoções), bem como as de caráter sensorial (visão, audição, olfato e paladar), justificando assim sua rica inervação e notória representação no SNC. É o local onde desordens de caráter agudo e crônico mais comumente ocorrem, como a disfunção temporomandibular, hipersensibilidade dentinária (HD), dores de cabeça e neuralgia do nervo trigêmeo (SESSLE, BARRY J., 2000; SESSLE, BARRY J., 2011; IWATA, KOICHI ET AL., 2011).

Os tecidos craniofaciais são, quase que exclusivamente, inervados por ramos do nervo trigêmeo (com exceção de algumas áreas supridas por outros nervos cranianos e cervicais) e os seus corpos celulares de suas respectivas fibras aferentes primárias estão predominantemente localizados no interior do gânglio trigeminal (GT) (SESSLE, BARRY J., 2011). Uma vez ocorrida a ativação dos diferentes tipos de terminais aferentes, a resultante desse evento é a geração de uma série de potenciais de ação que são conduzidos até o SNC proporcionando ao indivíduo informações discriminativas sensoriais a respeito da localização, qualidade, intensidade e duração do estímulo (SESSLE, BARRY J., 2011; IWATA, KOICHI ET AL., 2011).

Nos nociceptores são geradas informações dolorosas com características afetivo motivacionais. Estes podem ainda desenvolver um aumento prolongado da excitabilidade após uma lesão tecidual ou inflamação (atividade espontânea), se tornando cada vez passíveis de serem sensibilizados ou até mesmo responderem a estímulos inócuos

(SESSLE, BARRY J., 2011; IWATA, KOICHI et al., 2011), processo este denominado “sensibilização periférica” (CHICHORRO, JULIANA GEREMIAS, PORRECA, FRANK, SESSLE, BARRY, 2017).

Juntamente a isso ocorre a síntese e liberação de diferentes tipos de mediadores químicos como glutamato, ácido gama-aminobutírico (GABA), serotonina e noradrenalina e neuropeptídeos como substância P (SP) e peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) com ação direta no SNC, acompanhado da expressão de diversos receptores, canais iônicos como canais de sódio e seus fatores transcrição, fator neurotrófico derivado do cérebro, transdução de canais de potenciais receptores transientes (TRPs), bem como o aumento da atividade das células gliais satélite (CGS). Todas essas alterações bioquímicas, seja em condições inflamatórias ou neuropáticas, se manifestam nos corpos celulares do GT e fibras aferentes (SESSLE, BARRY J., 2011; CHICHORRO, JULIANA GEREMIAS, PORRECA, FRANK, SESSLE, BARRY, 2017; IWATA, KOICHI et al., 2011; SIQUEIRA, S. R. D. T. et al., 2009; LULZ, ANA PAULA et al., 2015; TANAKA, BRIAN S. et al., 2016; XU, WENHUA et al., 2016).

As fibras aferentes primárias (especialmente as fibras A- δ e C) do nervo trigêmeo se projetam desde a polpa dentária (SACERDOTE, PAOLA; LEVRINI, LUCA., 2012) via corpos celulares neurais para o GT, em seguida até o tronco encefálico, mais precisamente no complexo nuclear sensorial do tronco encefálico (CNSTE), local onde transmissões sinápticas com neurônios de segunda ordem acontecem. O CNSTE é subdividido em núcleo sensorial principal e espinal, sendo este último compreendido em três subnúcleos: 1) subnúcleo oral, 2) subnúcleo interpolar e 3) subnúcleo caudal (SESSLE, BARRY J., 2000; DUBNER, RONALD; BENNETT, GARY J., 1983). Este último merece uma atenção especial, uma vez que toda esta circuitaria aferente do nervo trigêmeo, já citada, que pode ser sensibilizada por estímulos de natureza termal inócua ou nociva tem seus corpos celulares localizados predominantemente nele ou em adjacências no corno da raiz dorsal da medular (CRDM) nas regiões cervicais C1 e C2. Comumente faz a analogia desse subnúcleo com o CRDM, em função dessas duas regiões possuírem similaridades fisiológicas e morfológicas (SESSLE, BARRY J., 2000; SESSLE, BARRY J., 2011; IWATA, KOICHI ET AL., 2011; DUBNER, RONALD; BENNETT, GARY J., 1983).

Uma ampla gama de mediadores inflamatórios é produzida por diferentes tipos de células em resposta à lesão tecidual, e esses mediadores desempenham papéis diferentes na modulação da sensibilidade à dor (COUTAUX, ANNE et al., 2005). Os mediadores inflamatórios liberados atuam sobre os receptores específicos expressos no neurônio sensorial nociceptivo e resultam na produção de segundos mensageiros e na ativação de proteínas quinase e das fosfolipases. Os segundos mensageiros regulam a atividade de muitos receptores e canais iônicos, levando à sensibilização periférica. Os canais iônicos abrem em resposta a estímulos nocivos iniciando e propagando potenciais de ação nos neurônios sensoriais (HUCHO, TIM; LEVINE, JON D., 2007). Os neuropeptídeos são hoje considerados determinantes principais do processo inflamatório nos tecidos periféricos, um fenômeno também conhecido como inflamação neurogênica (RICHARDSON, JENNELLE DURNETT; VASKO, MICHAEL R., 2002). Evidências crescentes também estão apoiando o papel dos neuropeptídeos nos mecanismos moleculares subjacentes à dor dentária (CAVIEDES-BUCHELI, JAVIER et al., 2008).

Também de importância clínica é a multiplicidade de mediadores químicos periféricos, receptores, canais iônicos e processos intracelulares envolvidos na ativação ou sensibilização dos aferentes nociceptivos. Estes representam alvos potenciais para o desenvolvimento de abordagens terapêuticas mais eficazes para controlar a dor. De fato, uma melhor compreensão da nocicepção periférica conduziu ao desenvolvimento de agentes terapêuticos que visam mecanismos específicos. Os exemplos incluem inibidores da ciclo – oxigenase 2 (COX-2), que têm suas principais ações analgésicas e anti-inflamatórias nos tecidos periféricos (por exemplo, na síntese de prostaglandina E2 [PGE2]), reduzindo a inflamação, modulando a excitabilidade aferente nociceptiva e alterando a hiperalgesia associada a alguns estados de dor craniofacial (CHICHORRO, JULIANA GEREMIAS, PORRECA, FRANK, SESSLE, BARRY, 2017).

Acredita-se que a alteração das moléculas incluindo neuropeptídeos, receptores, citocinas e fatores de crescimento em neurônios do GT seja um mecanismo possível que causa um aumento na excitabilidade dos mesmos após a lesão do nervo trigêmeo. Muitos relatos anteriores descreveram o acúmulo de uma variedade de neuropeptídeos, como a SP, CGRP e fatores neurotróficos em neurônios trigeminiais após lesão do nervo trigêmeo (WAKISAKA, S. et al. 1987; HARADA, FUMIKO et al. 2003). Por exemplo, a expressão

do receptor purinérgico P2X3 em neurônios GT aumentou num modelo de dor neuropática trigeminal produzido por ligação parcial do nervo infraorbital, e a hipersensibilidade ao calor produzida por ligação parcial nervo infraorbital foi deprimida pelos antagonistas dos receptores purinérgicos (SHINODA, MASAMICHI et al. 2007). O ácido ribonucleico mensageiro (RNAm) da preprotaquinina que codifica dois neuropeptídeos moduladores da dor bem conhecidos, a SP e a neuroquinina A, aumenta a expressão nos neurônios aferentes primários na zona mandibular no GT após a lesão do nervo trigêmeo (TSUZUKI, KENZO et al., 2003).

A SP é um neuropeptídeo produzido em um subconjunto de células sensoriais com sensibilidade à capsaicina, que estão localizadas no gânglio da raiz dorsal e GT, desempenhando um papel crucial na transmissão de estímulos nocivos na medula espinhal (SEYBOLD, V. S., 2009). Além disso, a estimulação do terminal periférico sensitivo sensível à capsaicina dos neurônios resulta na liberação periférica de vários neuropeptídeos, incluindo SP (MAGGI, CARLO ALBERTO., 1995). Embora seja sabido que outros neuropeptídeos ao lado da SP também estão presentes nos mesmos neurônios sensitivos sensíveis à capsaicina, sendo também pró-inflamatórios, como o CGRP e neuroquinina A-B (COUTAUX, ANNE et al., 2005; SEYBOLD, V. S., 2009). No entanto SP pode ser considerado o peptídeo mais representativo envolvido na inflamação neurogênica e é o que mais recebe atenção de estudiosos em fisiologia e patologia dentária (SACERDOTE, PAOLA, LEVRINI, LUCA., 2012). A SP pertence à mesma família de neuropeptídeos que as neuroquininas (NK) A e B (MAGGI, CARLO ALBERTO., 1995; HARRISON, SELINA, GEPPETTI, PIERANGELO., 2001), sendo codificada pelo gene preprotaquicinina A no corpo dos neurônios aferentes primários no gânglio da raiz dorsal e no GT, assim então transportada para os processos centrais e periféricos desses elementos (MAGGI, CARLO ALBERTO., 1995; HARRISON, SELINA, GEPPETTI, PIERANGELO., 2001).

É amplamente aceito que vários fatores podem ativar os nociceptores no local da lesão tecidual (SEYBOLD, V. S., 2009; CHENG, JEN-KUN; JI, RU-RONG., 2008) e induzir a liberação do neuropeptídeo na periferia. A capsaicina, o calor e os prótons ativam o receptor vanilóide 1 (VR1), localizado nas fibras sensoriais de pequeno diâmetro, resultando na abertura de um canal de cátions, aumentando a entrada de cálcio

através desse canal e canais de cálcio ativados pela despolarização induzida por sódio. Estes efeitos aumentam a liberação de SP dos neurônios sensoriais (RICHARDSON, JENNELLE DURNETT, VASKO, MICHAEL R., 2002). Outros compostos não excitam diretamente os neurônios sensoriais, mas os sensibilizam, pois diminuem o limiar de disparo. As prostaglandinas, produzidas no tecido inflamado, ligam-se ao seu receptor nas fibras sensoriais e diminuem os limiares de disparo dos neurônios através do AMPc (AMP cíclico) e da proteína quinase A. Como consequência, eles também aumentam a liberação de SP em resposta à capsaicina, bradicinina e outros estímulos. (RICHARDSON, JENNELLE DURNETT, VASKO, MICHAEL R., 2002).

A SP é abundantemente contida nas fibras que inervam a polpa dentária e a dentina (CAVIEDES-BUCHELI, JAVIER et al., 2008 [A]). A produção e liberação dessa molécula é aumentada com a estimulação nociva, térmica, mecânica e química da polpa dentária, bem como no ligamento periodontal (CAVIEDES-BUCHELI, JAVIER et al., 2008 [A]; CAVIEDES-BUCHELI, JAVIER et al., 2009; CAVIEDES-BUCHELI, JAVIER et al., 2008 [B]; AWAWDEH, LAMA A. et al., 2002). A quantidade de SP liberada por cada fibra sensorial aumenta ainda mais durante os processos inflamatórios, o que sustenta o círculo vicioso subjacente à inflamação (CAVIEDES-BUCHELI, JAVIER et al., 2011; RODD, HELEN D., BOISSONADE, FIONA M., 2000). A liberação de SP e sua posterior ligação com receptores NK que estão acoplados à proteína G específicas, geram efeitos biológicos (HARRISON, SELINA, GEPETTI, PIERANGELO., 2001). Existem três tipos de receptores de taquicinas, NK1 (neuroquinina 1), NK2 (neuroquinina 2) e NK3 (neuroquinina 3), que exibem preferências pela SP, visto que ela atua primariamente nos receptores NK1 (HARRISON, SELINA, GEPETTI, PIERANGELO., 2001) e a ativação deste induz diretamente a vasodilatação com aumento da permeabilidade vascular, permitindo o extravasamento plasmático e desgranulação de mastócitos. Vale ressaltar que estes receptores estão em alta concentração nos tecidos dentários (FRISTAD, I. et al., 2003; PARK, C. K. et al., 2010).

Os grânulos de mastócitos liberam histamina, que por sua vez amplifica os processos vasculares e ativa os nociceptores (MORIARTY, DEREK et al., 2001). Linfócitos, granulócitos e macrófagos têm receptores para SP e essas células podem ser estimuladas para produzir citocinas. Macrófagos estimulados por SP produzem os

mediadores inflamatórios PGE2, tromboxanos, bem como as citocinas pró-inflamatórias interleucina 1 (IL-1), interleucina 6 (IL-6) e TNF (fator de necrose tumoral) (HARRISON, SELENA, GEPETTI, PIERANGELO., 2001). Todos esses eventos moleculares sustentam, em última instância, a síntese e a liberação de uma nova quantidade de SP, perpetuando, assim, um círculo vicioso. Além disso, esses mecanismos não envolvem apenas fibras no local do dano tecidual, mas também se estendem aos tecidos não danificados vizinhos, onde causam hiperalgesia secundária (SACERDOTE, PAOLA, LEVRINI, LUCA., 2012). Portanto, a SP pode ser considerada um importante mediador de inflamação neurogênica e hiperalgesia associada e representa um alvo promissor para terapias que visam controlar a dor e minimizar as consequências deletérias da lesão tecidual (SACERDOTE, PAOLA, LEVRINI, LUCA., 2012).

Os mecanismos envolvidos no processo de mineralização dos vários sistemas biológicos têm sido estudados ao longo de muitos anos. Apesar de todo o progresso alcançado, os eventos que levam ao início da mineralização dos tecidos cuja matriz é composta principalmente por colágeno ainda não são bem compreendidos. A hidroxiapatita é um tipo de apatita biológica que impregna nos tecidos mineralizados, formado cristais que variam de tamanho. Para sua formação é necessária uma fonte de íons cálcio e fosfato no organismo, onde a resultante dessa combinação é denominada fosfato de cálcio, que posteriormente são depositados em sítios de nucleação, para então, a mineração ter continuidade (KATCHBURIAN, EDUARDO, ARANA, VICTOR., 2017).

Até pouco mais da metade da década de 1960, os pesquisadores na área de mineralização trabalhavam com base na ideia de que algum componente da matriz (sobretudo o colágeno, constituinte mais abundante) desempenharia papel fundamental no início da mineralização. Pouca ou nenhuma importância era conferida a uma possível participação das células nesse processo. Somente no final daquela mesma década foi identificada a presença de “fragmentos citoplasmáticos” contendo cristais de mineral na matriz orgânica da cartilagem em calcificação. Essas estruturas arredondadas e envolvidas por uma unidade de membrana, denominadas vesículas da matriz, foram observadas também no osso embrionário e na dentina, sempre contendo cristais de mineral antes do restante da matriz orgânica. São, portanto, os locais em que, primeiro,

são visualizados os cristais no processo de mineralização (KATCHBURIAN, EDUARDO, ARANA, VICTOR., 2017).

As vesículas da matriz se originam nas próprias células produtoras da matriz orgânica, isto é, odontoblastos, osteoblastos e condroblastos. A célula, a princípio, desenvolve na sua superfície espécie de bulbos, que, logo após, destacam-se, tornando as vesículas independentes da matriz. A composição das vesículas da matriz inclui uma série de moléculas, muitas das quais têm relação com o processo de mineralização. As vesículas contêm glicoproteínas, e sua membrana, que apresenta também fosfolipídios ácidos, é associada a proteoglicanos/glicosaminoglicanos. Outra característica da matriz é a existência de fosfatase alcalina, enzima de natureza glicoproteica que libera íons fosfato de moléculas orgânicas ligadas ao fosfato (KATCHBURIAN, EDUARDO, ARANA, VICTOR., 2017). Sua atividade fundamental é carregar para matriz importantes potencialidades celulares, tais como a atividade da fosfatase alcalina e macromoléculas capazes de ligarem ao cálcio. É possível que as mitocôndrias contribuam para o armazenamento de cálcio e/ ou fosfato. Íons cálcio e fosfato se acumulam nas vesículas da matriz, alcançando níveis que levam a precipitação de fosfato de cálcio seguida pela rápida formação de hidroxiapatita sob a forma de pequenas placas muito finas (KATCHBURIAN, EDUARDO, ARANA, VICTOR., 2017).

A dentina é sintetizada pelos odontoblastos, consideradas células pós-mitóticas que são formadas através da divisão e diferenciação de células no ectomesênquima da papila/polpa dentária, estas então, originadas das células da crista neural multipotente. Durante o processo de dentinogênese, os odontoblastos secretam primeiro uma matriz não mineralizada que se encontra entre os corpos celulares e a frente mineralizada. Este tecido não mineralizado, nomeadamente a pré-dentina, torna-se eventualmente a dentina mineralizada após a deposição de minerais de cálcio e fósforo sobre o suporte de fibrilar constituído principalmente por colágeno do tipo I. A dentina formada antes do término da formação das raízes é denominada dentina primária (DP), enquanto a dentina formada após o término da formação das raízes e associada ao processo normal de envelhecimento é designada dentina secundária (DS) (NANCI A., 2003). Dentina terciária (DT) é produzida em reação a estímulos/lesões nocivas externas, como atrito e cárie dentária (NANCI A., 2003; TZIAFAS, D., 2004). Com base no tipo e extensão de

estímulos externos ou lesões, juntamente com as células responsáveis pela formação da DT, a mesma é ainda classificada em dentina reacionária (DRea) e dentina reparadora (DRep). Após estímulos leves, não causando a morte de odontoblastos pré-existentes, a DRea é formada por essas células. Após estímulos severos, seguidos da morte dos odontoblastos pré-existentes, a DRep é produzida por células semelhantes a odontoblastos diferenciadas (NANCI, 2003). Os precursores do odontoblastos podem se diferenciar em células semelhantes a odontoblastos, que produzem uma matriz de DRep (SANGWAN, P. et al., 2013). DRep é uma reconstituição da arquitetura do tecido no local da ferida e desempenha um papel crítico na proteção da vitalidade da polpa e na manutenção de sua função (TÉCLÈS, ODILE et al., 2008).

Além disso, para o colágeno tipo I, os odontoblastos também secretam uma série de proteínas não-colágenas (PNCs) em sua matriz extracelular (MEC) durante o processo de dentinogênese. Essas PNCs promovem e regulam ativamente a mineralização de fibras de colágeno e o crescimento de cristais de hidroxiapatita dentro da pré-dentina quando esse tecido mole é convertido em dentina mineralizada. A Pequena Família de Ligação Integrada, família de Glicoproteínas N-Ligadas (SIBLING) é uma categoria de PNCs, e esta família de moléculas, característica para dentina e osso, inclui proteína 1 da matriz dentinária (P1MD), sialofosfoproteína dentina (DSPP), sialoproteína óssea (SPO) e osteopontina (OPN) (FISHER, L. W. et al., 2001). Os membros dessa família compartilham certas características comuns, como a abundância de aminoácidos ácidos, a presença do motivo Arg-Gly-Asp (RGD) (FISHER, L. W. et al., 2001; QIN, CHUNLIN, BABA, OTTO, BUTLER, W. T., 2004). Numerosos estudos mostraram que esses membros da família SIBLING desempenham papéis essenciais na formação e mineralização da dentina, osso e cimento (QIN, CHUNLIN, BABA, OTTO, BUTLER, W. T., 2004).

Nos tecidos mineralizados, a OPN é encontrada principalmente no osso, cimento e pré dentina (QIN, CHUNLIN, BABA, OTTO, BUTLER, W. T., 2004; SODEK J, GANSS B, MCKEE MD., 2000; MOSES, KYLE D., BUTLER, WILLIAM T., QIN, CHUNLIN., 2006). Após um processo de injúria ao tecido pulpar, frente a ação de um estímulo nocivo, ocorre o processo de dentinogênese, onde os odontoblastos recém-diferenciados secretam moléculas responsáveis pela formação da DRep (YE, LING et al., 2004; SREENATH,

TADURU et al., 2003; ZHU, QINGLIN et al., 2012). A detecção de OPN no DRep indica que as células odontoblastos recém-diferenciados, sob a influência de uma condição traumática, podem estar tentando produzir um tecido duro em um ritmo muito rápido para proteger as células de estímulos externos prejudiciais (XIE, XIAOHUA et al., 2014). Além disso, a presença de OPN no estágio inicial de formação da DMP1 (molécula sinalizadora que promove a diferenciação de células mesenquimais em odontoblastos-recém diferenciados) durante a dentinogênese reparativa (NARAYANAN, KARTHIKEYAN et al., 2001; ALMUSHAYT, A. et al., 2006), sugere que essa proteína pode estar inicialmente envolvidas na regulação da adesão de células tipo odontoblastos recém-diferenciadas à matriz de dentina recém-formada (BELLAHCENE, AKEILA et al., 2000).

Na busca de novas modalidades terapêuticas, compreensão dos mecanismos responsáveis pela geração e manutenção da dor e identificação dos componentes celulares e/ou moleculares intervenientes (MILLSON, DAVID, TEPPER, STEWART. SCHOLZ J, WOOLF CJ., 2003), as células gliais do SNC e mais recentemente as dos gânglios sensitivos, têm-se evidenciado como importantes nestes mecanismos, visto que possuem a habilidade de estabelecer a comunicação com os neurônios e de modular a sua atividade (MCMAHON, STEPHEN B., MALCANGIO, MARZIA., 2009; HANANI, MENACHEM., 2010).

Nos gânglios sensitivos, particularmente no gânglio da raiz dorsal e no GT, as CGS estabelecem uma relação privilegiada com os corpos neuronais que rodeiam (HANANI, MENACHEM., 2005). As interações entre as CGS e os neurônios, e as consequências destas na excitabilidade neuronal, são um dos focos mais recentes de pesquisa na área da dor, sendo que nos últimos dez anos o número de publicações sobre o papel destas células na atividade neuronal tem aumentado exponencialmente (COSTA, FILIPA ALEXANDRA LEITE, MOREIRA NETO, FANI LOURENÇA., 2015). Assim como as células de *Schwann*, as CGS são derivadas das células pluripotentes da crista neural (JESSEN, KRISTJAN R., MIRSKY, RHONA., 2005). Morfologicamente se caracterizam por serem de formato laminar, irregular, geralmente mononucleares e com expansões lamelares e microvilosidades que aumentam a sua área de superfície (PANNESE E., 1981; PANNESE E., 2010). Estas células se dispõem em torno do corpo de cada neurônio e da porção proximal do seu axônio, formando uma bainha em torno de cada corpo

celular. Cada corpo celular rodeado pela sua bainha de CGS forma uma unidade morfológica e funcionalmente distinta (HANANI, MENACHEM., 2005, PANNESE, E. et al., 1991). As CGS de uma bainha estão acopladas, entre si, por junções aderentes e de hiato, e estão separadas da bainha perineural vizinha por tecido conjuntivo (HANANI, M. et al., 2002; PANNESE, E. et al., 1996).

A nível fisiológico, as CGS são consideradas como as células equivalentes no sistema nervoso periférico aos astrócitos do SNC, sendo a investigação das suas características marcada por esta analogia. Partilham com eles propriedades como a regulação da concentração iônica do espaço extracelular e reciclagem de neurotransmissores. São marcadores moleculares de ambas: 1) glutamina sintase (*glutamine synthase*), 2) proteínas da família S100 que participam na regulação do cálcio intracelular e a 3) expressão de proteína glial fibrilar ácida (*glial fibrillary acidic protein*) (GFAP) (6). Eletrofisiologicamente, as CGS exibem um potencial de membrana de repouso altamente negativo, expressam canais de cálcio e de potássio dependentes de voltagem e Kir4.1 (inward rectifying K⁺ channels) (CHERKAS, PAVEL S. et al., 2004; ZHANG, HAIJUN et al., 2009). Expressam também inúmeros receptores de moléculas bioativas potencialmente intervenientes em interações com outras células sendo que muitos deles foram, recentemente, implicados na gênese e manutenção da dor crônica, nomeadamente os receptores purinérgicos P2Y (CERUTI, STEFANIA et al., 2008; VILLA, GIOVANNI et al., 2010) e P2X7 (ZHANG, X. et al., 2007), o CGRP (LI, JING, VAUSE, CARRIE V., DURHAM, PAUL L., 2008), SP (TAKEDA, MAMORU, TAKAHASHI, MASAYUKI, MATSUMOTO, SHIGEJI., 2009), citocinas e quimiocinas, como por exemplo o fator de necrose tumoral alfa (TNF α) (DUBOVÝ, PETR et al., 2006) e a interleucina 1 beta (IL-1 β) (LI, MAN et al., 2005).

Inicialmente, a principal função atribuída ao corpo celular dos neurônios aferentes primários correspondia à sustentação metabólica, garantindo a manutenção dos níveis ótimos de canais iônicos, receptores e proteínas nos terminais centrais e periféricos. Nas últimas décadas, têm sido acumuladas evidências da existência de propriedades morfológicas e fisiológicas que colocaram definitivamente de lado o papel passivo atribuído ao corpo celular na trajetória da informação da periferia para o SNC, sendo uma grande peculiaridade morfológica presença de vários receptores de neurotransmissores

(SHINDER, V., DEVOR, M., 1994). Outros indicadores surgiram em estudos eletrofisiológicos *in vivo*, onde se observou que a excitação dos neurônios do gânglio da raiz dorsal conduzia ao desenvolvimento de potenciais de ação nos neurônios vizinhos, uma propriedade denominada em inglês por “*cross-excitation*”. Esses potenciais foram confirmados em estudos *in vitro*, nos quais a estimulação repetida desses neurônios induzia uma despolarização transitória dos neurônios vizinhos nesse gânglio, provavelmente mediada por mensageiros químicos (AMIR, R., DEVOR, M., 1996, AMIR, R., DEVOR, M., 1999). De acordo com esse pressuposto, foi constatado que em resposta a uma estimulação elétrica ou química ocorre a liberação (HUANG, L.-YM, NEHER, E., 1996) de mediadores químicos difusíveis capazes de alterar a excitabilidade no gânglio sensorial. Exemplos desses mediadores são a SP, a adenosina trifosfato (ATP), o ácido γ -amino-butírico (GABA), o CGRP e o glutamato (ZHANG, X. et al., 2007; LI, JING, VAUSE, CARRIE V., DURHAM, PAUL L., 2008; HUANG, L.-YM, NEHER, E., 1996; GU, YANPING et al., 2010).

Por outro lado, o corpo celular encontra-se completamente envolvido pela bainha de CGS, sugerindo que a influência desses mediadores sobre os neurônios adjacentes seja indireta, envolvendo as CGS (YANPING et al., 2010). O arranjo peculiar das CGS nos gânglios sensoriais garante uma íntima associação do corpo neuronal com as CGS, permitindo que estas células gliais controlem o ambiente perineural, e facilitem a comunicação não sináptica entre estes dois tipos celulares (LI, JING, VAUSE, CARRIE V., DURHAM, PAUL L., 2008; TAKEDA, MAMORU; TAKAHASHI, MASAYUKI; MATSUMOTO, SHIGEJI., 2009; GU, YANPING et al., 2010; SUADICANI, SYLVIA O. et al., 2010). De fato, foi recentemente demonstrada a existência de interações bidirecionais entre os neurônios sensitivos e as CGS (GU, YANPING et al., 2010; SUADICANI, SYLVIA O. et al., 2010). A forma como a comunicação neurônio - CGS se processa, os intervenientes no processo, e as suas repercussões na modulação da informação aferente estão longe de estarem esclarecidos. Todavia, alguns dos potenciais candidatos para mediar esta sinalização parácrina são a SP, o CGRP, as citocinas, as endotelinas, o óxido nítrico (NO) e o ATP (TAKEDA, MAMORU; TAKAHASHI, MASAYUKI; MATSUMOTO, SHIGEJI., 2009).

A lesão nervosa periférica induz a liberação de neurotransmissores, como o CGRP, a SP, a ATP e NO, no ambiente perineural. Estes mediadores ativam as células gliais satélite, através dos respectivos receptores localizados na superfície membrana destas células. Esta ativação induz a liberação de citocinas, como o $TNF\alpha$ e a $IL-1\beta$, que por sua vez podem influenciar a excitabilidade neuronal através dos receptores específicos ($TNF\alpha$ -RI e IL-1RI) (TAKEDA, MAMORU; TAKAHASHI, MASAYUKI; MATSUMOTO, SHIGEJI., 2009).

Em relação a SP, verificou-se aumento da sua liberação, após inflamação orofacial, constituindo o primeiro indício de que este neuropeptídeo desempenha um papel importante na sinalização parácrina, estabelecida no gânglio após a inflamação. (MATSUKA, YOSHIZO et al., 2001; NEUBERT, JOHN K. et al., 2000). Isto foi confirmado posteriormente, após constatarem que o aumento da liberação de SP pelos nociceptores A- δ e C, foi acompanhado de um aumento da expressão de receptores NK1 nos neurônios não nociceptivos A β circundantes (TAKEDA, MAMORU et al., 2005 [A]; TAKEDA, MAMORU et al., 2005 [B]). Para além disto, foi sugerido que este neuropeptídeo pode ativar as CGS através dos receptores NK1, de forma que as CGS respondem com a síntese e liberação de IL1-beta (TAKEDA, MAMORU; TAKAHASHI, MASAYUKI; MATSUMOTO, SHIGEJI., 2009). A expressão de NK1 nas CGS não foi diretamente avaliada, contudo foi demonstrada a expressão do NK1 com elevada afinidade para a SP em astrócitos e micróglia (MARRIOTT, Ian., 2004).

A pesquisa em modelos animais de dor, a maioria realizados em roedores e baseados essencialmente em lesões periféricas por axotomia, inflamação ou constrição, indica que a lesão nervosa não induz apenas modificações nos neurônios, mas também nas CGS do gânglio sensitivo. Tal como as células gliais do SNC, as CGS são ativadas nestas condições. O conceito de ativação está baseado na noção de que, em condições normais, as células gliais são espectadoras do processo nociceptivo, mas após a lesão periférica, reagem exibindo alterações morfológicas e liberando mediadores gliais (MCMAHON, STEPHEN B.; MALCANGIO, MARZIA., 2009). Como o alvo da lesão são os neurônios, as alterações observadas nas CGS são secundárias a alterações neuronais e implicam a ativação de mecanismos de sinalização entre os neurônios e

estas células (COSTA, FILIPA ALEXANDRA LEITE; MOREIRA NETO, FANI LOURENÇA., 2015).

1.2 Hipersensibilidade dentinária (HD) - O problema

A HD é uma condição clínica bastante comum, caracterizada como uma dor intensa e transitória pela exposição da dentina em resposta a estímulos táteis, químicos ou osmóticos (WEST, NICOLA XANIA et al., 2013). É um problema evidentemente persistente na rotina diária dos profissionais da área odontológica, representando um dos seus maiores desafios (ZEOLA, LIVIA FAVARO; SOARES, PAULO VINÍCIUS; CUNHA-CRUZ, JOANA, 2019).

Com relação a sua epidemiologia, a nível global, os valores variam de 1.3% a 92.1% (ZEOLA, LIVIA FAVARO; SOARES, PAULO VINÍCIUS; CUNHA-CRUZ, JOANA, 2019) e no Brasil os números variam de 19.0% (SILVA, MARKELANE SANTANA et al., 2019) a 55% (RAPOSO, FERNANDA et al., 2019). visto que tal heterogeneidade de dados está associada à população rastreada, processo de recrutamento, ao cenário do estudo e aos diferentes critérios de diagnóstico utilizados para a coleta de dados (REES, J. S.; ADDY, M, 2004; WEST, NICOLA XANIA et al., 2013).

Etiologicamente, a HD possui características multifatoriais como por exemplo a recessão gengival (alterações periodontais atróficas, onde a gengiva marginal sofre migração apical, resultando na exposição radicular ao ambiente oral) (BEVENIUS, JOAN; LINDSKOG, SVEN; HULTENBY, KJELL, 1994; JATI, ANA SUZY; FURQUIM, LAURINDO ZANCO; CONSOLARO, ALBERTO, 2016), abrasão (lesão cervical não cariiosa caracterizada pelo desgaste da superfície dentária em razão da técnica de escovação inadequada gerando pressão excessiva, assim como o uso de agentes abrasivos) (GOW, ALEX M.; KELLEHER, MARTIN GD, 2003; MILOSEVIC, ALEX., 2017), abfração (lesão na região cervical de um ou mais dentes em forma de cunha afiada em razão do grande esforço oclusal excêntrico com conseqüente flexão da estrutura dentária, fadiga dos cristais de hidroxiapatita e surgimento da lesão) (DE SOUSA, LINDOALDO XAVIER et al., 2018), atrição (desgaste fisiológico da superfície dentária ou restauração causada pelo contato de um dente com o outro durante o processo de mastigação ou para a função) (BARTLETT, DAVID, 2007; CARDOSO, A. C., 2007) e a erosão (processo químico resultante da dissolução do esmalte e dentina por ácidos não derivados de

bactérias, podendo ser origem de origem intrínseca [doença do refluxo gastroesofágico] ou extrínseca [consumo regular de alimentos ácidos e bebidas isotônicas]) (BARBOUR, M. E.; LUSI, ADRIAN, SHELLIS, R. P., 2011).

As bebidas isotônicas são um componente importante da dieta dos atletas. Eles são frequentemente confundidos com “bebidas energéticas”, que possuem uma composição significativamente diferente. Bebidas energéticas contêm estimulantes, como cafeína ou extrato de guaraná, que estimulam o sistema nervoso central. As bebidas isotônicas, por outro lado, fornecem ao corpo humano hidratação, suplementos e minerais adequados, perdidos pela transpiração durante a atividade física. Para os atletas, as diretrizes para o consumo de bebidas esportivas isotônicas estão claramente definidas. Recomenda-se beber pequenas quantidades da bebida antes, durante e após o treinamento (OSTROWSKA, ANETA et al., 2016; RODRIGUEZ, NANCY R.; DIMARCO, NANCY M.; LANGLEY, SUSIE, 2009).

1.3 Fisiologia do complexo dentino-pulpar e mecanismos biomoleculares relacionados

A polpa dentária é a responsável pelos principais mecanismos fisiológicos que conferem vitalidade ao elemento dental, dentre eles a produção de células ectomesenquimais, os odontoblastos: células especializadas da polpa dentária originárias da crista neural (MAYOR & THEVENEAU, 2013) que migram sob o epitélio bucal e finalmente se diferenciam em células que organizarão e regularão a síntese da matriz dentinária mineralizada (ARANA-CHAVEZ & MASSA, 2004; KAWASHIMA & OKIJI, 2016). Durante a maturação, os odontoblastos exibem mudanças na expressão gênica, adquirindo uma morfologia típica com um corpo e um processo longo (SIMON et al., 2009; BYERS & WESTENBROEK, 2011). Os corpos celulares dos odontoblastos estão localizados no complexo de interface dentina-polpa, onde são organizados em uma paliçada entre os tecidos mineralizados (esmalte e dentina) e o tecido vivo (a polpa) do dente. De fato, os odontoblastos são conectados em seu polo apical (isto é, as zonas que conectam os corpos com os processos) por numerosos complexos juncionais (junções e desmossomo) formando uma barreira seletiva controlando a relação e tráfico entre dentina e polpa e vice-versa em condições fisiológicas e patológicas (SOLÉ-

MAGDALENA, ANTONIO et al., 2018). Os processos de odontoblastos estão contidos nos túbulos dentinários banhados no fluido dentinário (ARANA-CHAVEZ & MASSA, 2004).

A HD é uma condição de hiperalgesia, ou seja, uma sensação desagradável frente à estímulos inócuos, resultante da exposição da dentina que se constitui em um tecido microscopicamente rico em canalículos, que são preenchidos internamente por prolongamentos odontoblásticos, terminações nervosas e conteúdo aquoso. É uma dor breve, aguda e produzida em resposta a estímulos térmicos, químicos, osmóticos, evaporativos e táteis (HOLLAND, GR1 et al., 1997). O mecanismo da HD tem sido objeto de muitas investigações recentes (SABERI, SOGOL et al., 2018), sendo que até o momento destacam-se 3 hipóteses:

a) Teoria hidrodinâmica:

Onde se atribui a HD à estimulação nervosa pelo movimento de fluidos dentro dos túbulos dentinários. A sensibilidade dentinária é causada por sua exposição a estímulos mecânicos, químicos ou térmicos (BRÄNNSTRÖM et al., 1979). Quando o esmalte é removido ou lesionado, e os túbulos da dentina abertos, o conteúdo líquido dos túbulos dentinários, os odontoblastos, as fibras terminais do nervo trigêmeo no interior do dente sofrem exposição aos agentes sensibilizadores. Assim, a sensibilidade dentinária resulta da ativação de neurônios sensoriais dentais (isto é, trigeminais) por vários estímulos mecânicos, térmicos ou químicos que afetam o fluido dentinário, o conteúdo dos túbulos dentinários (nervosos e odontoblásticos) e as células da polpa dentária (SOLÉ-MAGDALENA, ANTONIO et al., 2018).

b) Teoria neural:

Aborda a comunicação da polpa dental com o gânglio trigêmeo (GT) feita pelas fibras sensitivas pós-ganglionares. Estas fibras são terminações nervosas livres estão amplamente disseminadas no tecido dentinário e pulpar que reagem diretamente à estimulação (PORTO, ISABEL CCM, ANDRADE, ANA KM, MONTES, MARCOS AJR., 2009). Os nervos que entram na polpa dentária consistem em fibras simpáticas sensitivas e pós-ganglionares que surgem dos neurônios trigeminais. Dentro da polpa dentária, eles inervam os vasos sanguíneos, as células pulpares e os odontoblastos através de fibras

que evoluíram a partir do chamado plexo subodontoblástico. Os odontoblastos, tanto na borda da polpa dentinária quanto no interior dos túbulos dentinários, são mantidos por uma densa rede de fibras nervosas sensoriais mielinizadas A-Delta (A δ) e C não mielinizadas. Entretanto, a estrutura definitiva dos contatos entre os odontoblastos e o plexo subodontoblástico ainda não foi elucidada (ALLARD, BRUNO et al., 2006).

As fibras A δ estão localizadas principalmente na borda polpa-dentina e atingem a camada odontoblástica basal, enquanto as fibras C entram nos túbulos dentinários (BYERS, M. R., NARHI, M. V. O., 1999). Um estudo em dentes humanos demonstrou que cerca de 30 - 70% dos processos odontoblásticos estão em contato com as terminações nervosas que entram nos segmentos mais internos dos túbulos dentinários. Esses autores também observaram que cada túbulo dentinário contém uma única fibra nervosa que varia em relação ao processo odontoblástico de adjacência simples a um circundamento (CARDA, C., PEYDRO, A., 2006).

c) Teoria do odontoblasto:

Os odontoblastos possuem um conjunto de canais iônicos mecanosensitivos, termosensitivos e quimiosensitivos, além do potencial transiente de detecção de substâncias ácidas (SOLÉ-MAGDALENA, ANTONIO et al., 2018). (BRÖNNIMANN, BEN VE et al., 2019) destacam a ativação de nociceptores específicos como a superfamília de TRPs, bem como a superfamília de canais iônicos sensíveis a ácidos (ASICs) localizados em fibras A δ e C.

Os TRPs são proteínas integrais de membrana que funcionam como canais iônicos. Esta superfamília de canais iônicos mostra uma variedade de mecanismos de ativação variando de tensão a mudanças de temperatura (NILIUS, BERND, OWSIANIK, GRZEGORZ, 2011; NILIUS, OWSIANIK, SZALLASI, ARPAD, 2014). ASICs são canais catiônicos seletivos de sódio (Na⁺) que são sensíveis a voltagem que monitoram desvios moderados dos valores fisiológicos do pH extracelular (WALDMANN, RAINER et al., 1997; LINGUEGLIA, ERIC, 2007; LUMPKIN, ELLEN A., CATERINA, MICHAEL J., 2007; BARON, ANNE, LINGUEGLIA, ERIC, 2015), podendo funcionar como mecanossensores e nociceptores (WEMMIE, JOHN A., PRICE, MARGARET P., WELSH, MICHAEL J., 2006; HOLZER, PETER, 2009; SHERWOOD, THOMAS W., FREY, ERIN N., ASKWITH,

CANDICE C., 2012; ZHA, XIANG-MING, 2013; HOLZER, PETER, IZZO, ANGELO A., 2014; OMERBAŠIĆ, DAMIR et al., 2015). É importante salientar que em relação aos neurônios trigeminais, quase todos os canais iônicos envolvidos em todas as modalidades sensoriais foram detectados nessas células (VANDEWAUW, INE, OWSIANIK, GRZEGORZ, VOETS, THOMAS., 2013), assim como nos odontoblastos (MAGLOIRE, HENRY et al., 2010).

1.4 Diagnóstico e tratamento

A HD é um problema comum entre a população, sendo uma das principais razões que levam os pacientes a procurarem tratamento odontológico (CHEN, C. L. et al., 2015; YOSHIZAKI, K. T. et al., 2017). A redução da HD está diretamente relacionada com melhora na qualidade de vida (DOUGLAS-DE-OLIVEIRA, DHELFESESON WILLYA et al., 2018). No entanto, um diagnóstico preciso é fundamental para a execução do tratamento de sucesso, visto que a HD tem a dor como sintoma característico de outras condições clínicas (ex: cárie dentária, fratura de esmalte, pulpite irreversível e sensibilidade pós-clareamento dental) (ORCHARDSON, ROBIN; GILLAM, DAVID G., 2006; MIGLANI, SANJAY; AGGARWAL, VIVEK; AHUJA, BHOMIKA, 2010; MINOUX, MARYLINE; SERFATY, RENE, 2008).

Isto posto, antes de se considerar qualquer tipo de estratégia de tratamento é muito importante o profissional estar atento as evidências científicas na literatura no que diz respeito aos indivíduos pertencentes aos grupos de risco da HD: a) escovadores excessivamente entusiastas, b) pacientes submetidos a tratamento periodontal, c) pacientes que sofrem de bulimia, d) pacientes com xerostomia, e) consumidores de comidas/bebidas ácidas, f) pacientes com recessão gengival e g) fumantes ou que mascam tabaco. Uma vez essa fase negligenciada, o profissional estará colocando todo o tratamento em risco de insucesso (GILLAM, D. G.; ORCHARDSON, R., 2006).

Os agentes dessensibilizantes são classificados quanto ao 1) modo de utilização (caseiro [técnica de fácil execução, indicado para a aplicação em vários dentes] e em consultório [executado apenas por profissionais capacitados e em um número limitado de dentes]) e 2) mecanismo de ação (aqueles que podem interferir na resposta neural

dolorosa vinculada ao estímulo nocivo [cremes dentais contendo sais de potássio, como cloreto de potássio, citrato de potássio e nitrato de potássio] ou aqueles com capacidade de oclusão dos túbulos dentinários bloqueando o fluxo do líquido tubular [fluoreto de sódio a 2%, oxalato de potássio a 98%, vernizes de fluoreto, sistemas adesivos, bioglass, cimento de silicato e proteína da caseína do leite] (ORCHARDSON, ROBIN; GILLAM, DAVID G., 2006; MIGLANI, SANJAY; AGGARWAL, VIVEK; AHUJA, BHOOMIKA, 2010; CUMMINS, DIANE, 2010; MORRIS, M. F.; DAVIS, R. D.; RICHARDSON, B. W., 1999; PILLON, FLÁVIO L.; ROMANI, INGRID G.; SCHMIDT, ÉDINA R., 2004; LEE, YOON; CHUNG, WON-GYUN., 2011; LONE, A. et al., 2002; PORTO, ISABEL CCM; ANDRADE, ANA KM; MONTES, MARCOS AJR., 2009; VOLLENWEIDER, MERET et al., 2007).

1.5 Fotobiomodulação (FBM)

Os *lasers* foram propostos como um complemento às terapias de prevenção convencionais, de maneira que os avanços na tecnologia aumentaram sua aplicação na odontologia e no tratamento da HD (ESTEVEES-OLIVEIRA, M. et al., 2009; RANJAN, RAJEEV et al., 2013). Dois tipos de *lasers* podem ser usados para o tratamento da HD, *lasers* de baixa potência: Hélio-Neônio (He-Ne), diodo e Arseneto de Gálio e Alumínio (GaAlAs), e *lasers* alta potência: Neodímio: Ítrio-alumínio-granada (Nd: YAG), Dióxido de Carbono (CO₂), Érbio: Ítrio-alumínio-granada (Er: YAG) e Érbio-Cromo: Ítrio-Escândio-Gálio-Granada (Er, Cr: YSGG). Atuam no tratamento da HD através de dois mecanismos: 1) o efeito direto na atividade elétrica das fibras nervosas presentes na polpa dentária dessensibilizando os nervos sensoriais, bloqueando a transmissão de estímulos nocivos dos túbulos dentinários para o sistema nervoso central e 2) a obstrução dos túbulos dentinários por meio do derretimento (*melting*) da estrutura dental (KIMURA, YUICHI et al., 2000; WEST, N. X., 2006). Além disso, a FBM pode estimular o aumento função celular resultando em menos lesão ou inflamação do tecido pulpar após injúrias causadas por estímulos provenientes do meio externo, ou seja, intraoral (KIMURA, YUICHI et al., 2000; TAY, LIDIA YILENG et al., 2009).

É um método alternativo para o controle da dor, uma vez que promove mudanças na transmissão nervosa na polpa dentária ao invés de provocar qualquer tipo de mudança

na estrutura do tecido dentinário, como acontece nos *lasers* de alta potência, pois os mesmos causam aumento de temperatura e derretimento da superfície dentinária. Os mecanismos pelos quais a FBM exerce seus efeitos na redução da dor (desensibilização) é baseado na estimulação das células nervosas, mas especificamente a bomba de sódio e potássio (Na^+/K^+) (localizada na superfície membranar), interferindo na polaridade da membrana celular pelo aumento da amplitude do potencial de membrana, bloqueando assim, a transmissão do estímulo doloroso (WAKABAYASHI, HAJIME et al., 1993). Além disso, baixa transmissão de energia que ocorre através do esmalte e dentina resulta em uma reação no tecido pulpar promovendo efeitos biomoduladores (MACHADO, ALANA CRISTINA et al., 2018). O aumento do fluxo sanguíneo, redução da dor e inflamação são efeitos da FBM propostos por KARU, TIINA et al. (1989) que podem ser aplicados no contexto da desensibilização na HD.

A primeira lei da fotobiologia afirma que os fótons devem ser absorvidos por alguma molécula (chamada cromóforo) localizada dentro do tecido para ter qualquer efeito biológico (SUTHERLAND, John C., 2002). As mitocôndrias, além de exercer suas fundamentais funções na célula, desempenham um papel crucial no que diz respeito a interação luz-célula, contendo um dos principais cromóforos desencadeadores dos efeitos benéficos da FBM, o citocromo c oxidase (CCO) (PASSARELLA, SALVATORE, KARU, TIINA., 2014). Pesquisas que evidenciam os mecanismos envolvidos nos efeitos da FBM reforçam cada vez mais o envolvimento das mitocôndrias nesse processo, pois as mesmas desempenham um importante papel na produção de energia e metabolismo celular. Elas têm a capacidade de converter moléculas de alimentos em produto energético na forma do que conhecemos como ATP através de um processo denominado de fosforilação oxidativa (HUANG, YING-YING et al., 2009).

Existem muitas linhas de pesquisa mostrando que o CCO atua como um fotoreceptor e transdutor de sinais nas regiões vermelho e infravermelho próximo do espectro de luz (KARU, TIINA I., 2010). A FBM aumenta a disponibilidade de elétrons para a redução do oxigênio molecular no centro catalítico de CCO, aumentando o potencial de membrana mitocondrial e os níveis de ATP (WU, SHEENGNAN et al., 2014). O CCO é o complexo terminal da cadeia respiratória mitocondrial, responsável por cerca

de 90% do consumo de oxigênio nos mamíferos, e é essencial para praticamente toda a produção de energia nas células.

Os melhores resultados alcançados são em virtude dessa energia ser aplicada em níveis celulares, onde além dos efeitos previamente citados, existe também uma ação regenerativa pelo aumento da atividade metabólica das células semelhante a odontoblastos que são estimuladas a produzir uma maior quantidade de dentina terciária obliterando os túbulos dentinário (FERREIRA, ADRIANA NAYME SEGOVIA et al., 2006; LADALARDO, THEREZA CHRISTINNA CELLOS GONÇALVES PINHEIRO et al., 2004). Nesse sentido, foi demonstrado, em um modelo de exposição de polpa de molares de ratos, que a FBM foi capaz induzir a formação de DT, quando comparado com o grupo controle tratado com capeamento pulpar direto com curativo hidróxido de cálcio [Ca (OH) 2] (ARANY, PRAVEEN R. et al., 2014). Neste mesmo estudo (ARANY, PRAVEEN R. et al., 2014) foi também investigada a capacidade da FBM em direcionar a diferenciação de células tronco. Sabe-se que o fator de transformação do crescimento beta (TGF- β) tem um importante papel na diferenciação odontoblástica em mamíferos (SLOAN, A. J., SMITH, A. J., 1999; BEGUE-KIRN, CATHERINE et al., 2004).

As células-tronco dentárias humanas possuem alguns marcadores de superfície bem característicos do seu estado pluripotente (CD44, CD90, CD106, CD117), ou seja, estado esse que as possibilitam se diferenciarem em outros grupos celulares, sendo de fundamental importância para o processo de regeneração dentária. Os resultados obtidos demonstraram que a FMB ativou o TGF- β nas células-tronco dentárias humanas, de maneira que as mesmas demonstraram uma regulação negativa dos marcadores de pluripotência, além de exibirem um aumento de marcadores de diferenciação de odontoblastos como a P1MD, sialoproteína dentinária (SLD), OPN e fosfatase alcalina (KOBAYASHI, IEYOSHI et al., 2006; CHEN, SHUIBING et al., 2007).

2 JUSTIFICATIVA

A FBM tem sido muito utilizada como tratamento complementar em pacientes portadores de dores agudas e crônicas orofaciais, principalmente em razão dos seus efeitos analgésicos e antiinflamatórios. Embora sejam detectados resultados clínicos satisfatórios, a FBM ainda não é uma modalidade terapêutica bem estabelecida e seu

mecanismo de ação ainda não é bem compreendido, inclusive devido a grande variação de parâmetros, tais como, densidade de energia, potência, tempo de exposição, número de aplicações e duração do tratamento. Portanto, em virtude da refratariedade de outras modalidades terapêuticas no manejo da HD, este projeto objetiva, por meio da utilização de FBM em modelo experimental de HD em dentes de ratos, compreender, através de testes comportamentais e técnicas imuno-histoquímicas, os efeitos fotobiomoduladores sobre a nocicepção.

3 OBJETIVOS

Frente ao exposto, o objetivo geral do presente estudo é o desenvolvimento de um modelo experimental de HD em molares de ratos para avaliação dos efeitos analgésicos e antiinflamatórios da FBM, no espectro vermelho e infravermelho, bem como a avaliação de parte dos mecanismos envolvidos no seu efeito.

3.1 *Objetivos específicos*

- i)* padronizar um modelo experimental de HD em dentes de ratos induzido pela ingestão diária de solução isotônica (pH 2,87);
- ii)* realizar a avaliação comportamental por meio de estimulação térmica (jato de água gelada 4°C), e mensuração do desenvolvimento e o decurso temporal da nocicepção nos animais com HD;
- iii)* avaliar se o tratamento com FBM (vermelho e infravermelho) promove alteração na sensibilidade dolorosa dos animais com HD, 24h e 14 dias após o protocolo de 3 sessões consecutivas;
- iv)* verificar por meio de imuno-histoquímica a capacidade do tratamento com FBM (vermelho e infravermelho) em alterar a imunoreatividade da SP nos molares e GT dos ratos 24h após o protocolo de 3 sessões consecutivas;
- v)* avaliar o efeito da FBM (vermelho e infravermelho) sobre a ativação de CGS no GT de ratos avaliado por imuno-histoquímica 24h após o protocolo de 3 sessões consecutivas;
- vi)* avaliar se o efeito do tratamento com FBM (vermelho e infravermelho) promove alterações na imunoreatividade de OPN nos molares de ratos avaliado por imuno-histoquímica 14 dias após o protocolo de 3 sessões consecutivas.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizados 54 (cinquenta e quatro) (nenhum descarte) ratos machos da linhagem Sprague-Dawley, com 2 (dois) meses de vida, pesando entre 250 e 370 g, fornecidos pela rede de Biotérios do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB-USP). Os animais foram mantidos em ambiente com temperatura ($22^{\circ}\pm 2^{\circ}$ °C) e umidade (80%) controlados, com ciclo claro/escuro de 12/12 horas e livre acesso à ração e água.

Todos os procedimentos foram desenvolvidos em conformidade com o protocolo da Comissão de Ética em Experimentação Animal do ICB/USP (CEUA 5223250618). Os animais foram manipulados de acordo com os princípios e parâmetros para investigação de dor experimental (ZIMMERMANN, MANFRED, 1983).

4.1 Indução da hipersensibilidade em dentes de rato

A HD foi induzida através da erosão dentária promovida pela ingestão diária de solução isotônica (S.I) (sabor limão, pH 2,87) por 45 dias conforme modelo proposto por BERGAMINI, MARCELO R. et al. (2014).

Os animais foram divididos em 4 grupos (n=52) como se segue:

Grupo 1: controle (CT) (ingestão de água);

Grupo 2: ingestão de S.I (sem tratamento de FBM)

Grupo 3: ingestão de S.I com tratamento de FBM 660 nm (S.I + FBM 660 nm);

Grupo 4: ingestão de S.I com tratamento de FBM 808 nm (S.I + FBM 808 nm).

4.2 Avaliação da hipersensibilidade térmica (AHT)

Evidências científicas mostram que os dentes são mais sensíveis a temperaturas baixas do que altas (GEDALIA, I. et al., 1978), portanto, a hipersensibilidade foi avaliada por estímulo com jato de água gelada 4°C, 0,5 ml, por 5 segundos, na superfície vestibular dos molares dos animais que se encontravam semicontidos manualmente pelo pesquisador e a hipersensibilidade térmica medida atribuindo-se os *escores* de acordo com a resposta ao estímulo doloroso conforme a tabela 1 (BERGAMINI, MARCELO R.

et al., 2014). A AHT basal foi realizada 45 dias (tempo basal/ 0 hora) após o início da ingestão diária de S.I, 24h, 48h, 72h, e 14 dias após o fim do tratamento com FBM.

Quanto à avaliação nociceptiva, foi escolhido o método descrito por Bergamini e colaboradores (2014). Nesse modelo, os animais foram semicontidos pela pele dorso-cervical conforme preconizado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). Nesta posição a boca do animal se abre expondo os dentes incisivos e também os membros dianteiros são imobilizados.

Nessa posição introduzimos uma cânula de gavagem metálica, acoplada a uma seringa de 1 ml, contendo 0,5 ml de água a 4°C, apontada para a superfície vestibular do molar do animal. No momento da avaliação a água é despejada na boca do animal e o *score* nociceptivo é avaliado conforme descrito abaixo na tabela 1:

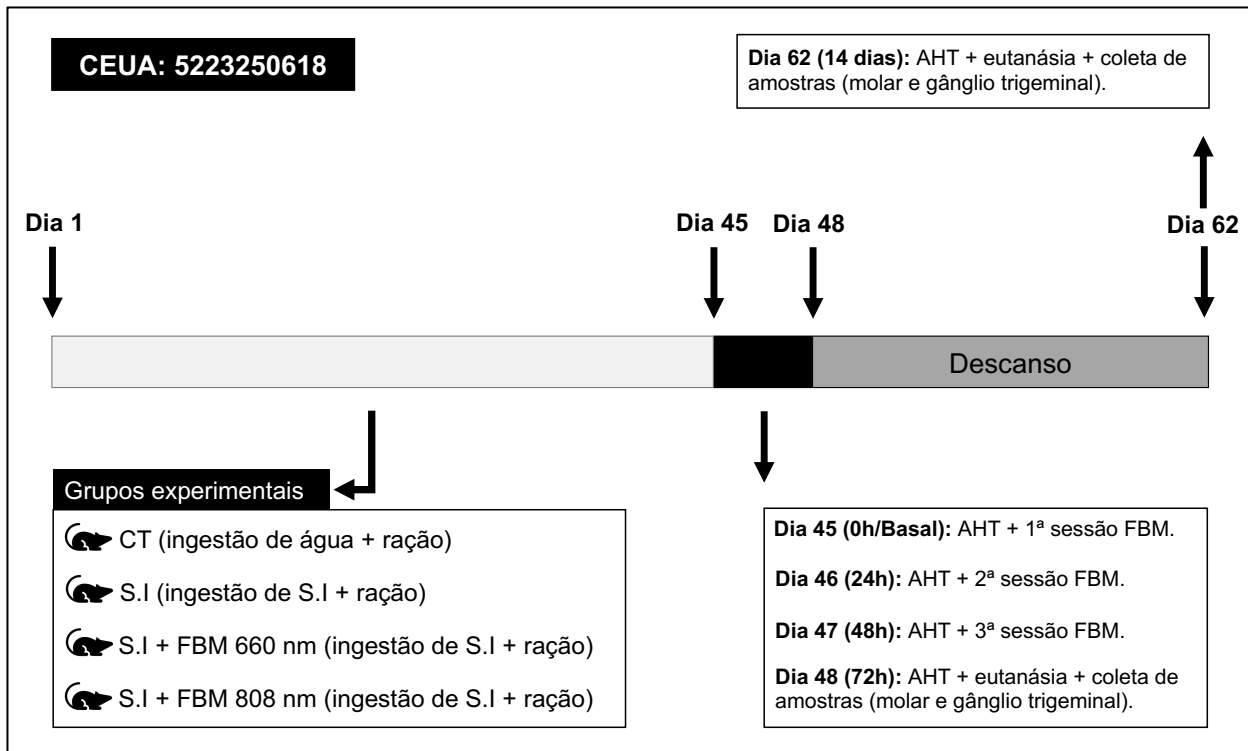
Tabela 1 - Descrição do comportamento frente ao estímulo térmico

SCORES	DESCRIÇÃO DO COMPORTAMENTO
0	Sem resposta
0,5	Suave contração do corpo
1	Contração do corpo
2	Forte contração do corpo e curta vocalização
3	Forte contração do corpo e prolongada vocalização

Fonte: (BERGAMINI, MARCELO R. et al., 2014).

Antes do início da AHT, os animais foram submetidos a sessões de condicionamento 2 dias anteriores ao experimento, sob temperatura controlada e iluminação ambiente. A AHT foi realizada em triplicatas, antes de cada uma das 3 sessões (0h, 24h e 48h), 72h (tempo equivalente a 24h após a finalização do protocolo de irradiação) e 14 dias após a terceira sessão da FBM conforme a figura 1. Os resultados foram analisados pela comparação das médias obtidas nos diferentes grupos experimentais.

Figura 1 - Delineamento experimental do protocolo de indução da HD e tratamento com FBM



Fonte: Autor (2020)

4.3 Tratamento com FBM

O tratamento foi realizado com a utilização do aparelho de Photon Laser III, semiconductor (D.M.C., São Carlos/SP, Brasil). Emissão de luz laser com comprimento de onda de 660 nm ou de 808 nm para bioestimulação nas áreas de odontologia, medicina geral e fisioterapia (DILSIZ, ALPARSLAN et al., 2010; DOSHI, SHREYA, JAIN, SANJAY, HEGDE, RASHMI., 2014). As sessões de FBM foram realizadas com os animais semiconscientes manualmente para que não houvesse nenhuma interferência na aplicação de FBM. Para tanto, a ponteira do dispositivo foi aplicada perpendicular a região vestibular do molar esquerdo do rato utilizando os parâmetros que estão descritos na tabela 2. Cada animal recebeu uma aplicação de FBM após as AHT ao frio realizadas nos tempos basal (0h), 24h e 48h, totalizando um número de 3 sessões consecutivas, com intervalo de 24h entre cada uma delas.

No que se refere aos comprimentos de onda escolhidos, ambos demonstraram diminuição tanto nos níveis de nocicepção observados na HD, quanto na diminuição da dor de lesões não cariosas, sendo esses comprimentos de onda utilizados na clínica

odontológica atualmente (DILSIZ, ALPARSLAN et al., 2010; DOSHI, SHREYA, JAIN, SANJAY, HEGDE, RASHMI., 2014). Desta forma, esses foram os comprimentos de onda escolhidos para iniciar nossos estudos sobre mecanismos envolvidos no efeito induzido pelo tratamento por FBM na HD.

Tabela 2 – Parâmetros utilizados no tratamento de FBM vermelho e infravermelho:

PARÂMETROS	FBM	
	660 nm	808 nm
Comprimento de onda (nm)	660 nm	808 nm
Energia	1 J	
Densidade de energia (J/cm ²)	36 J/cm ²	
Potência (mW)	100 mW	
Tempo de exposição (segundos)	10'	
Área irradiada (cm ²)	0,028 cm ²	
Densidade de potência	3,6 W/cm ²	
Técnica de irradiação	1 ponto fixo	
Distância entre pontos	0	
Energia por sessão	1J	
Energia total	3J	

Fonte: Autor (2020)

4.4 Imuno-histoquímica

Ao final dos ensaios comportamentais os animais foram anestesiados profundamente com Cetamina - Dopalen®, Sespo, na dose de 82 mg/kg; e cloridrato de Xilazina - Anasedan®, Sespo, na dose de 7,5mg/Kg e Acepromazina - Acepran®, Vetnil, na dose de 2.75/ kg. Em seguida, foi feita a perfusão transcardíaca dos animais com formaldeído a 4% e a coleta dos molares e GT esquerdos, sendo pós fixados em formaldeído a 4% por 4 horas e, após este período, o material foi transferido para uma solução de sacarose 30% em tampão fosfato 0,1 M (PB 0,1 M) onde foram armazenados

para realização de imuno-histoquímica. Os molares dos ratos foram descalcificados em ácido etilenodiamino tetra-acético a 4,13% (EDTA 4,13%) por 7 semanas. O tecido foi incluído em parafina para a posterior realização dos cortes em micrótomo na espessura de 5 µm (Leica: 820, Reichert - Jung). Os cortes foram coletados diretamente em lâminas histológicas e posteriormente armazenados a -20°C. Os GT foram incluídos em meio de congelação (Tissue tek), cortados em uma espessura de 5 µm em criostato (Leica CM 1850), sendo coletados diretamente em lâminas histológicas e posteriormente armazenados a -20 °C.

Para realização da imuno-histoquímica os cortes foram lavados 3x por 10 min em PB 0,1 M, seguido de incubação em anticorpo primário anti-osteopontina (AKm2A1, Santa Cruz Biotechnology, Inc, 1:500), anti-substância P (AB1566, Millipore, 1: 1000) e anti-proteína glial fibrilar ácida (MAB 360, Millipore, 1: 1000), diluídos em NDS 5% + Triton X-100 0,3% e incubados por 19 horas (overnight). Após a incubação com o anticorpo primário, os cortes foram lavados por 3x de 10 min em PB 0,1 M, incubados com anticorpo secundário biotililado diluído em Triton X-100 0,3% por 2 horas em temperatura ambiente. Após este procedimento foram submetidos a 3 lavagens de 10 min em PB 0,1 M, incubados com o kit complexo avidina-biotina (Kit ABC Vector Pk 6100) por 2 horas. Logo em seguida lavados 3x de 10 min em PB 0,1 M e posteriormente incubados por 10 minutos com o cromógeno DAB (diaminobenzidina) na concentração 0,5% em PB 0,1 M. Após esse período foi adicionado 300 µl de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) na concentração 0,3%, ficando o tecido exposto por um período de 3 minutos. Após a revelação em DAB foi feita a desidratação das lâminas, seguida do protocolo de contra coloração em hematoxilina e montagem das lâminas.

Os animais foram separados por grupos (n=5 para a análise em molares e n=3 para a análise em GT). Em molares, uma lâmina de cada animal (contendo dois cortes por dente na espessura de 5 µm) e em GT, uma lâmina de cada animal (contendo seis cortes por gânglio na espessura de 5 µm) foram selecionados para a realização da imuno-histoquímica.

4.5 Análise quantitativa

Para a análise quantitativa das características relacionadas à marcação dos anticorpos anti-osteopontina (AKm2A1, Santa Cruz Biotechnology, Inc, 1:500), anti-substância P (AB1566, Millipore, 1: 1000) e anti-proteína glial fibrilar ácida (MAB 360, Millipore, 1: 1000) utilizou-se o programa ImageJ 1.52u (Wayne Rasband, National Institutes of Health, EUA), optando-se pela densidade ótica integrada como o método de quantificação.

- **Em molares:** para cada corte foram realizadas 5 tomadas fotográficas em microscópio óptico (Nikon Elipse E800) no aumento de 40.000 x, visto que em cada foto foram analisados 3 quadrantes ($531.254 \mu\text{m}^2$) que correspondiam as principais áreas da amostra, ou seja, junção dentino-polpa e polpa (região central).
- **Em GT:** para cada corte foram realizadas 2 tomadas fotográficas em microscópio óptico (Nikon Elipse E800) no aumento de 20.000 x, visto que em cada foto foram analisados 3 quadrantes ($830.503 \mu\text{m}^2$) que correspondiam as principais áreas da amostra, ou seja, a região central e laterais direita e esquerda da amostra.

Com os valores de cada um dos quadrantes foi gerada uma média da tomada fotográfica. Utilizando as médias de cada uma das fotos obteve-se uma média do corte. Cada média do corte foi usada para se obter a média da lâmina ou média do animal.

4.6 Análise estatística

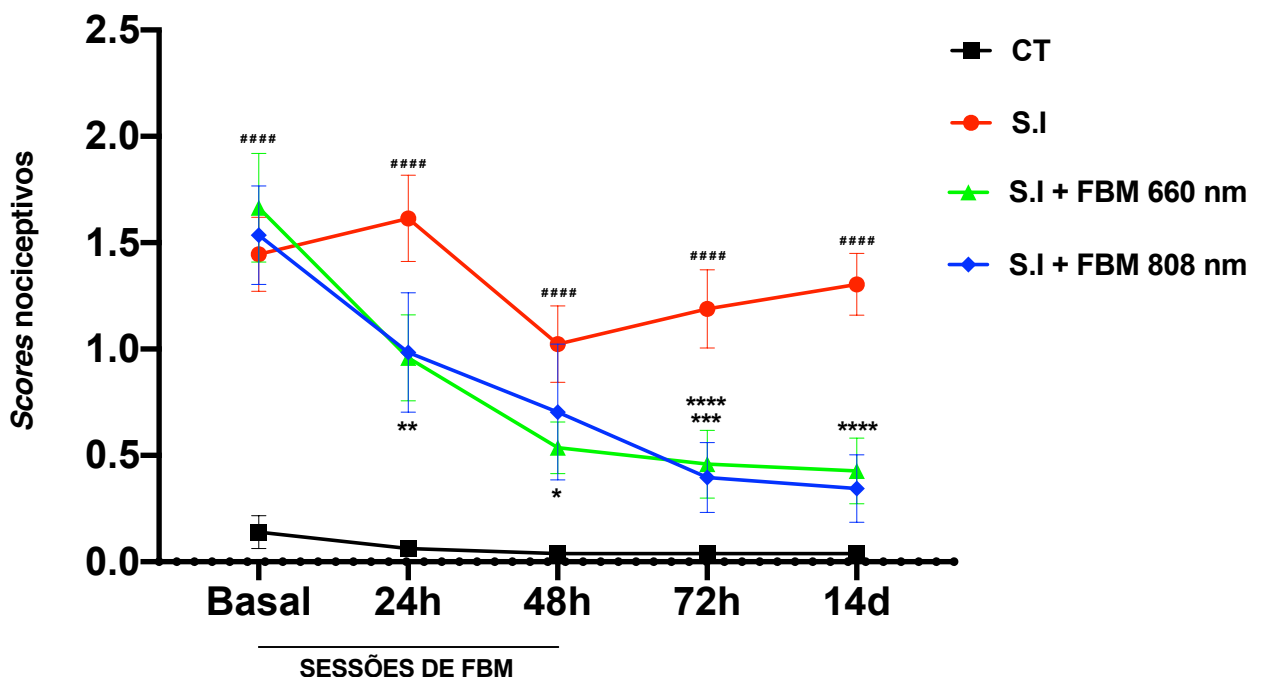
Os resultados obtidos foram expressos como média \pm erro padrão da média (e.p.m) e analisados estatisticamente por Análise de Variância (ANOVA). O teste de Bonferroni foi utilizado para detectar as diferenças das médias após a Análise de Variância. O índice de significância considerado foi de $p < 0,05$. Calculado com software GraphPad Prism/GraphPad Software Versão 8.2.1 Copyright ©, 1992-2020.

5 RESULTADOS

5.1 Efeito do tratamento com FBM sobre a HD de ratos avaliados em modelo de nocicepção térmica.

A ingestão de S.I (pH 2,87) induziu aumento na sensibilidade dolorosa de ratos avaliados pelo modelo de estimulação térmica induzida por jato de água fria (4°C). O tratamento com FBM reverteu a nocicepção para ambos os comprimentos de onda (660 nm e 808 nm) e apresentou efeito antinociceptivo quando avaliado 24h, 48h, 72h (tempo equivalente a 24h após a finalização do protocolo de irradiação) e 14 dias após o protocolo de 3 sessões consecutivas (gráfico 1).

Gráfico 1. Avaliação do efeito antinociceptivo da FBM frente ao teste de sensibilidade térmica ao frio. Os animais ingeriram S.I (pH 2.87) por 45 dias. Foram feitos testes de sensibilidade térmica ao frio (4°C) em uma medida basal, 24h e 48h com tratamentos de FBM (660 nm e 808 nm) intercalados (sempre após cada medida), totalizando um número de três sessões com intervalo de 24h entre cada uma delas. A medida em 72h teve como função a avaliação da resposta a curto prazo dos animais frente ao tratamento e em 14 dias verificou-se a resposta a longo prazo. A FBM (660 nm e 808 nm) induziu a antinocicepção quando avaliada 24h, 48h, 72h (tempo equivalente a 24h após a finalização do protocolo de irradiação) e 14 dias após o protocolo de 3 sessões consecutivas. Resultados apresentados como média \pm e.p.m. ANOVA em duas vias seguido de pós teste de Bonferroni: ##### $p < 0.0001$ S.I e S.I + FBM (660 nm e 808 nm) vs. CT; ##### $p < 0.0001$ S.I vs. CT; *** $p = 0.0003$ S.I vs. S.I 660 nm; **** $p < 0.0001$ S.I vs. S.I + FBM 808 nm; **** $p < 0.0001$ S.I vs. S.I + FBM (660 nm e 808 nm); ** $p = 0.0025$ S.I vs. S.I + FBM (660 nm e 808 nm) e * $p = 0.0353$ S.I vs. S.I + FBM 660 nm.

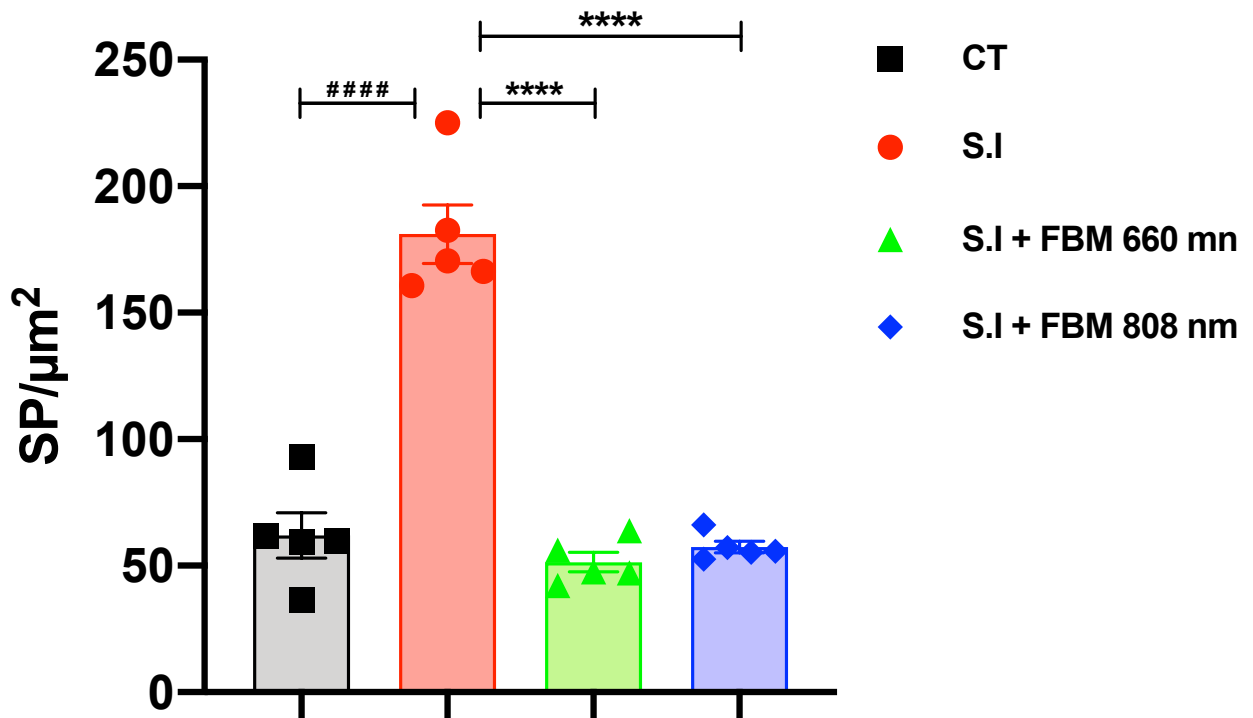


Fonte: Autor (2020)

5.2 Efeito do tratamento com FBM (vermelho e infravermelho) na imunoreatividade de SP em molares de ratos avaliado por imuno-histoquímica.

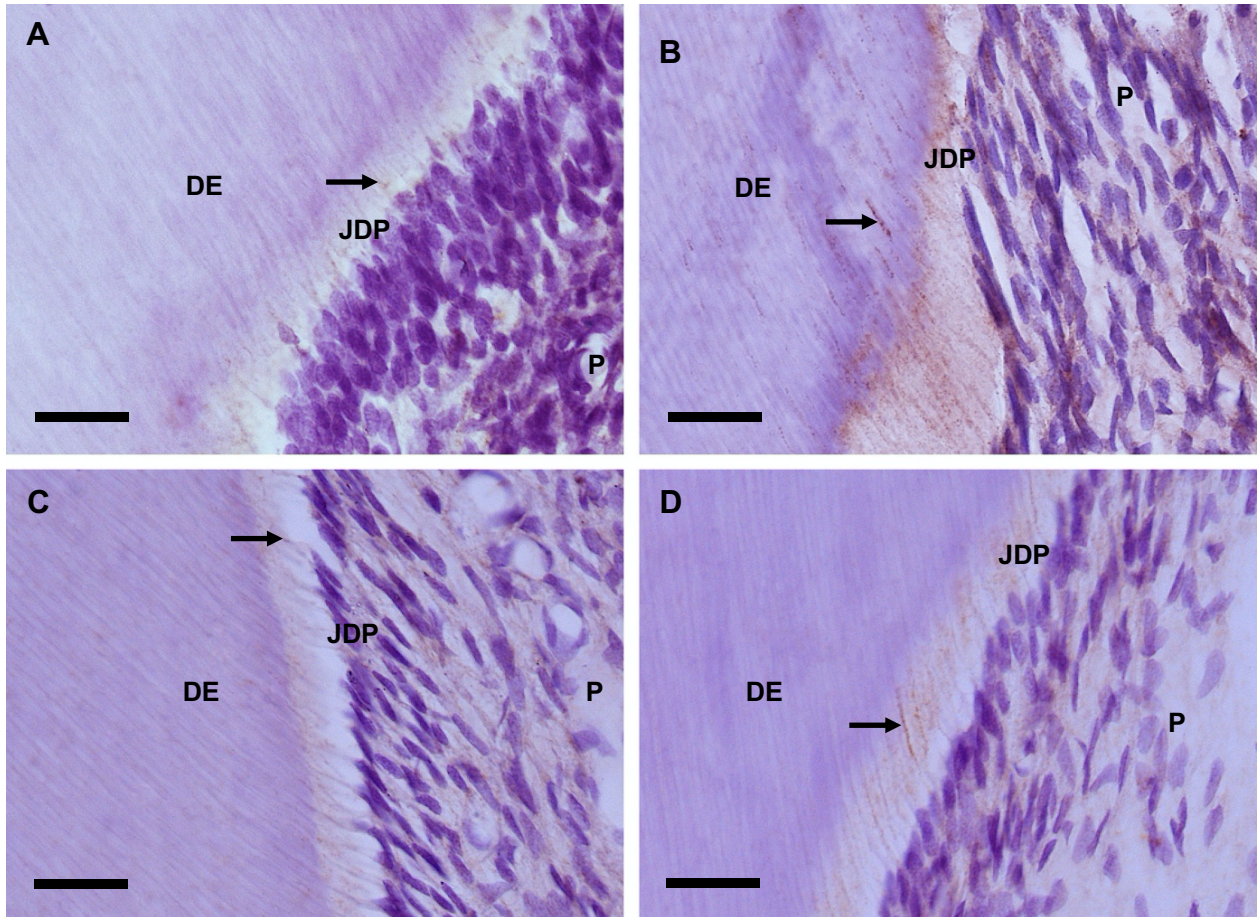
O tratamento por FBM induziu uma diminuição significativa na imunoreatividade de SP nos molares dos ratos que fizeram a ingestão S.I (45 dias) no comprimento de onda de 660 nm e 808 nm (gráfico 2).

Gráfico 2. Análise imuno-histoquímica de SP em molares em 72h. O eixo vertical faz referência a quantidade de SP analisada por μm^2 e no eixo horizontal estão distribuídos os grupos experimentais. Observa-se que a FBM (660 nm e 808 nm) induziu a diminuição da imunoreatividade de SP em 72h, ou seja, 24h após o protocolo de 3 sessões consecutivas observado na imagem. Os resultados apresentados como média \pm e.p.m. ANOVA em uma via seguido de pós teste de Bonferroni: ##### $p < 0.0001$ CT vs. S.I, **** $p < 0.0001$ S.I vs. S.I + FBM 660 nm e **** $p < 0.0001$ S.I vs. S.I + FBM 808 nm.



Fonte: Autor (2020)

Figura 2. Fotomicrografia representativa de imuno-histoquímica da dentina (DE), junção dentino-polpa (JDP) e polpa (P) contracorados com hematoxilina. Amostras (40.000 X, Barra: 20 µm) dos molares dos animais referentes aos grupos: CT (A), S.I (B), S.I + FBM 660 nm (C) e S.I + FBM 808 nm (D). A análise qualitativa demonstrou que a FBM (660 nm e 808 nm) induziu a diminuição da imunoreatividade de SP (seta) expressa pelos terminais nociceptivos quando avaliado em 72h, ou seja, 24h após o protocolo de 3 sessões consecutivas observado na imagem.

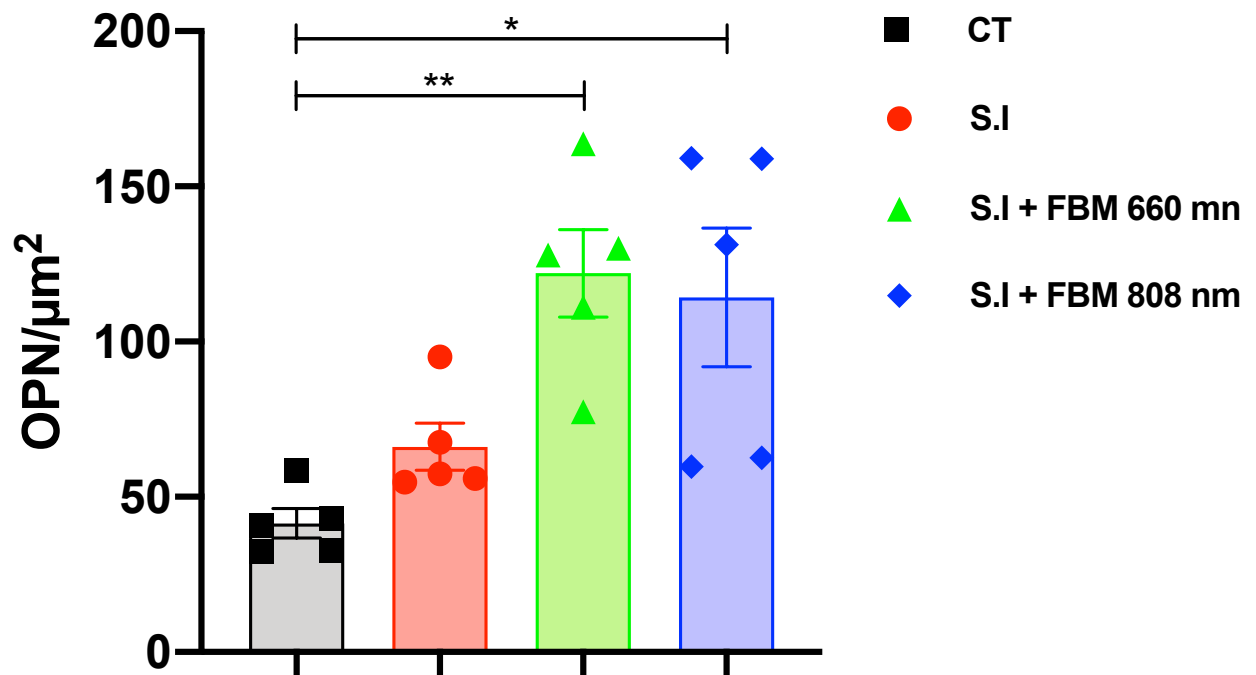


Fonte: Autor (2020)

5.3 Efeito do tratamento com FBM (vermelho e infravermelho) na imunoreatividade de OPN em molares de ratos avaliado por imuno-histoquímica.

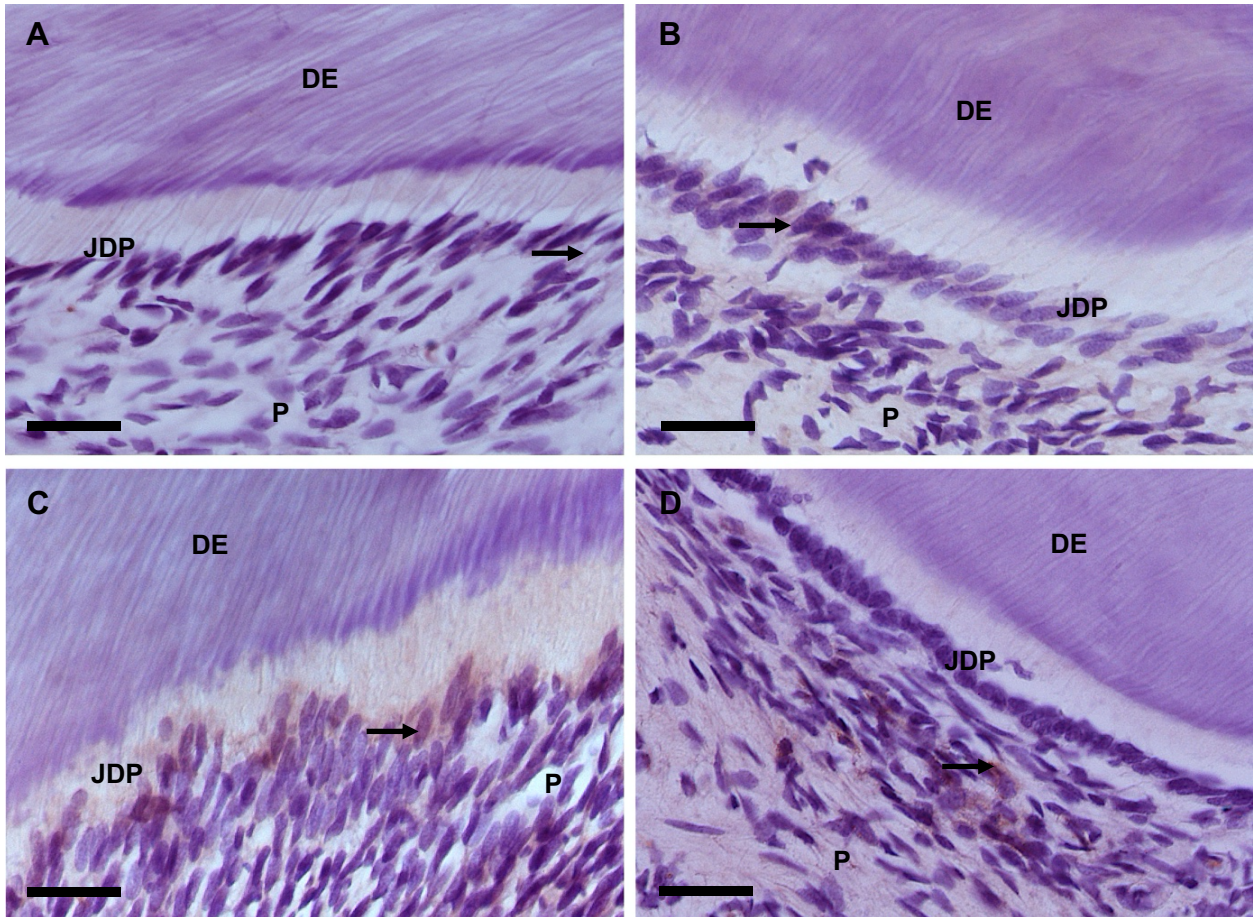
O tratamento por FBM induziu um aumento significativo na expressão de OPN nos molares dos ratos que ingeriram S.I (45 dias) em ambos os comprimentos de onda (660 nm e 808 nm) (gráfico 3).

Gráfico 3. Análise imuno-histoquímica de OPN em molares ao 14º dia. O eixo vertical faz referência a quantidade de OPN analisada por μm^2 e no eixo horizontal estão distribuídos os grupos experimentais. Observa-se que a FBM (660 nm e 808 nm) induziu o aumento da expressão de OPN **14 dias** após o protocolo de 3 sessões consecutivas. Os resultados apresentados como média \pm e.p.m. ANOVA em uma via seguido de pós teste de Bonferroni: ****p= 0.0051** CT vs. S.I + FBM 660 nm e ***p= 0.0117** CT vs. S.I + FBM 808 nm.



Fonte: Autor (2020)

Figura 3. Fotomicrografia representativa de imuno-histoquímica da dentina (DE), junção dentino-polpa (JDP) e polpa (P) contracolorados com hematoxilina. Amostras (40.000 X, Barra: 20 µm) dos molares dos animais referentes aos grupos: CT (A), S.I (B), S.I + FBM 660 nm (C) e S.I + FBM 808 nm (D). A análise qualitativa demonstrou que a FBM (660 nm e 808 nm) induziu um aumento da imunoreatividade de OPN (seta) expressa na camada odontoblástica quando avaliado em 14 dias após o protocolo de 3 sessões consecutivas observado na imagem.

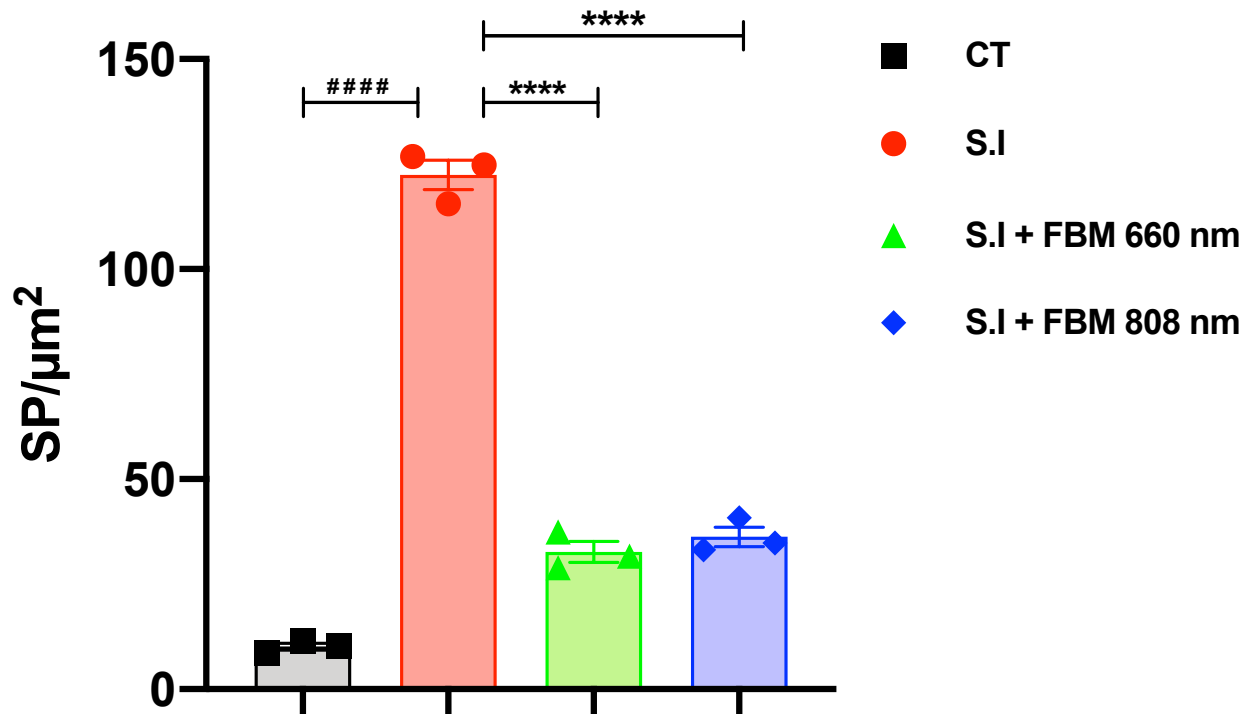


Fonte: Autor (2020)

5.4 Efeito do tratamento com FBM (vermelho e infravermelho) na imunoreatividade de SP em GT de ratos avaliado por imuno-histoquímica.

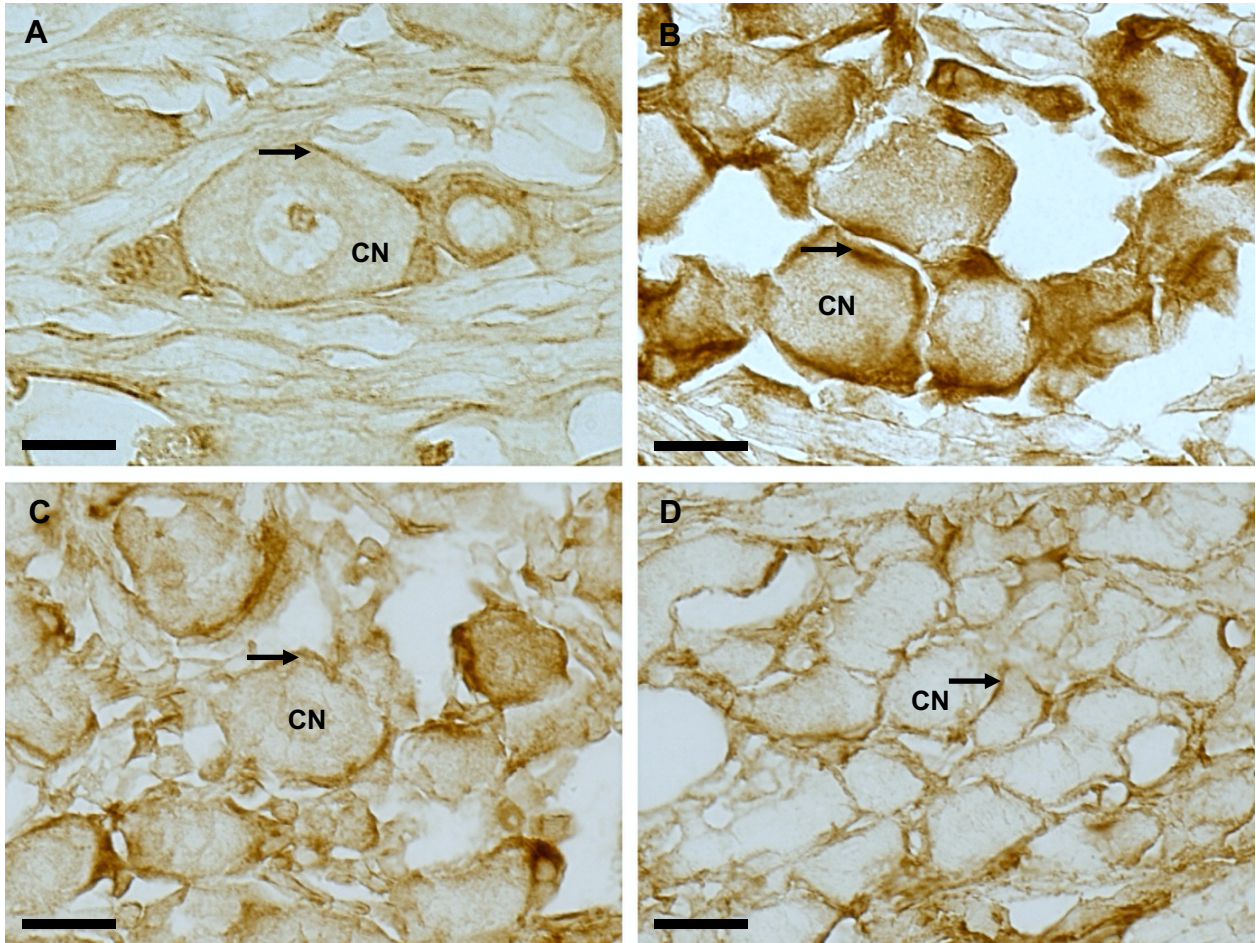
O tratamento por FBM induziu uma diminuição significativa na imunoreatividade de SP nos GT dos ratos que fizeram a ingestão S.I (45 dias) no comprimento de onda de 660 nm e 808 nm (gráfico 4).

Gráfico 4. Análise imuno-histoquímica de SP em GT em 72h. O eixo vertical faz referência a quantidade de SP analisada por μm^2 e no eixo horizontal estão distribuídos os grupos experimentais. Observa-se que a FBM (660 nm e 808 nm) induziu a diminuição da imunoreatividade de SP em 72h, ou seja, 24h após o protocolo de 3 sessões consecutivas observado na imagem. Os resultados apresentados como média \pm e.p.m. ANOVA em uma via seguido de pós teste de Bonferroni: **###p<0.0001** CT vs. S.I, ******p<0.0001** S.I vs. S.I + FBM 660 nm e ******p<0.0001** S.I vs. S.I + FBM 808 nm.



Fonte: Autor (2020)

Figura 4. Fotomicrografia representativa de imuno-histoquímica das células neuronais (CN) no interior do GT. Amostras (20.000 X, Barra: 20 μ m) dos GT dos animais referentes aos grupos: CT (A), S.I (B), S.I + FBM 660 nm (C) e S.I + FBM 808 nm (D). A análise qualitativa demonstrou que a FBM (660 nm e 808 nm) induziu a diminuição da imunoreatividade de SP (seta) expressa pelas CGS quando avaliado em 72h, ou seja, 24h após o protocolo de 3 sessões consecutivas observado na imagem.

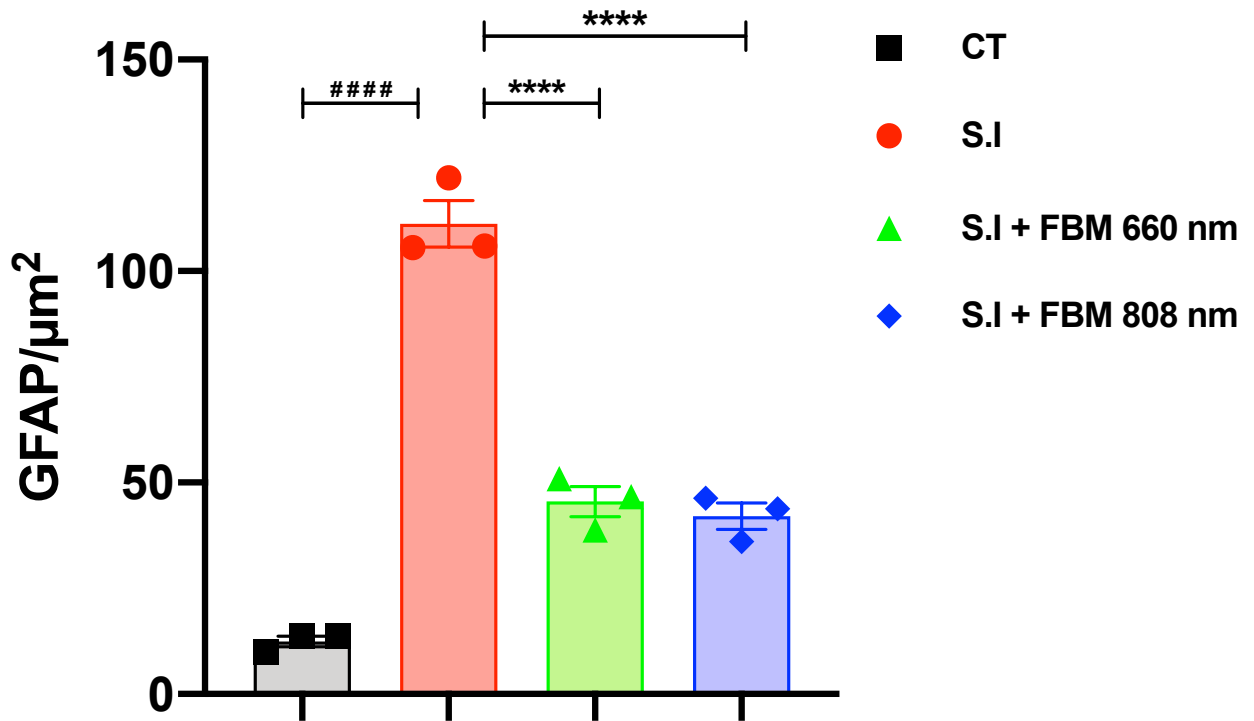


Fonte: Autor (2020)

5.5 Efeito do tratamento com FBM (vermelho e infravermelho) na imunoreatividade de GFAP em GT de ratos avaliado por imuno-histoquímica.

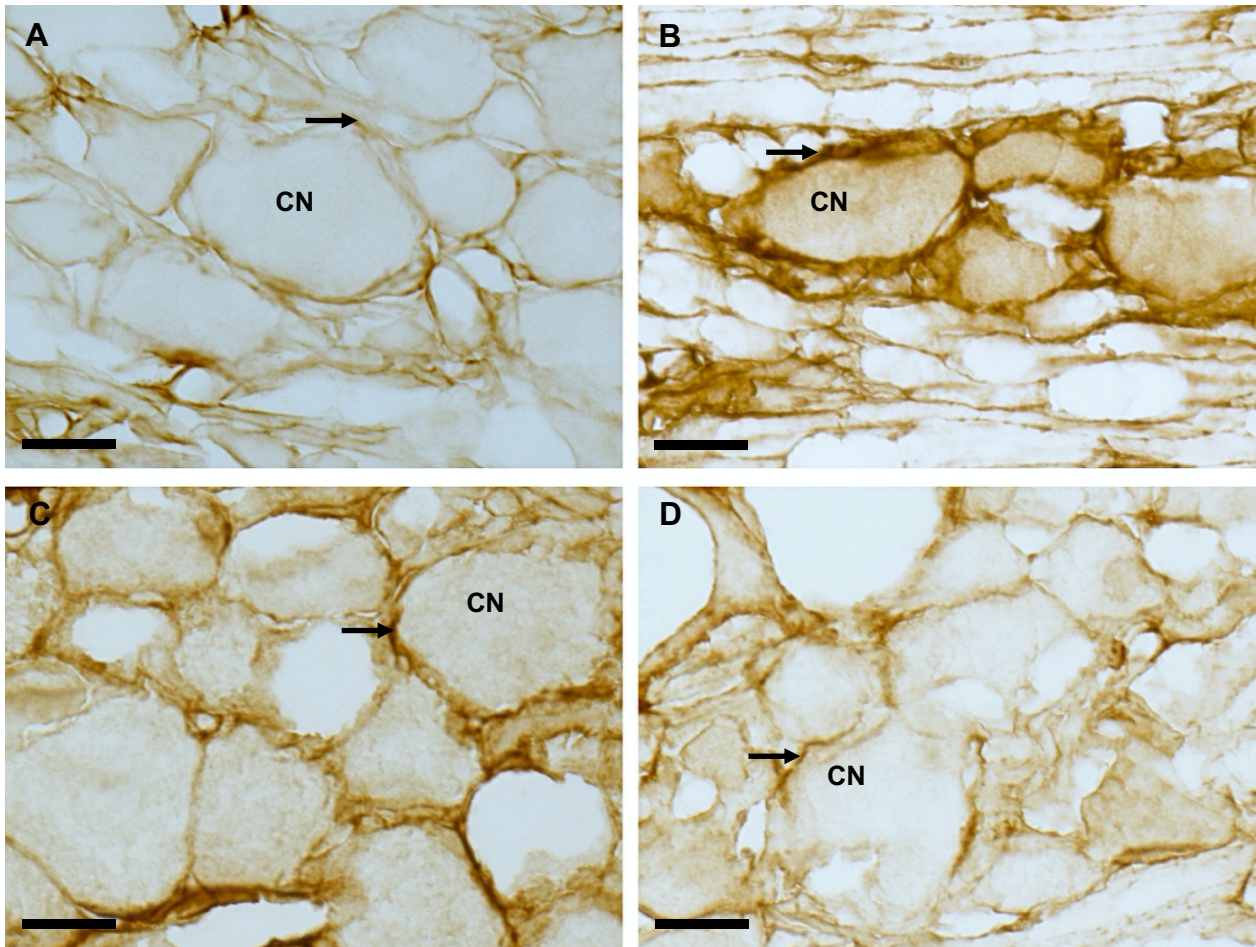
O tratamento por FBM induziu uma diminuição significativa na imunoreatividade de GFAP nos GT dos ratos que fizeram a ingestão S.I (45 dias) no comprimento de onda de 660 nm e 808 nm (gráfico 5).

Gráfico 5. Análise imuno-histoquímica de GFAP em GT em 72h. O eixo vertical faz referência a quantidade de GFAP analisada por μm^2 e no eixo horizontal estão distribuídos os grupos experimentais. Observa-se que a FBM (660 nm e 808 nm) induziu a diminuição da expressão de GFAP em 72h, ou seja, 24h após o protocolo de 3 sessões consecutivas observado na imagem. Os resultados apresentados como média \pm e.p.m. ANOVA em uma via seguido de pós teste de Bonferroni: ##### $p < 0.0001$ CT vs. S.I, **** $p < 0.0001$ S.I vs. S.I + FBM 660 nm e **** $p < 0.0001$ S.I vs. S.I + FBM 808 nm.



Fonte: Autor (2020)

Figura 5. Fotomicrografia representativa de imuno-histoquímica das células neuronais (CN) no interior do GT. Amostras (20.000 X, Barra: 20 μ m) dos GT dos animais referentes aos grupos: CT (A), S.I (B), S.I + FBM 660 nm (C) e S.I + FBM 808 nm (D). A análise qualitativa demonstrou que a FBM (660 nm e 808 nm) induziu a diminuição da imunoreatividade de GFAP (seta) expressa pelas CGS quando avaliado em 72h, ou seja, 24h após o protocolo de 3 sessões consecutivas observado na imagem.



Fonte: Autor (2020)

6 DISCUSSÃO

A HD é de fato uma condição que os cirurgiões-dentistas lidam diariamente na prática odontológica. Sua incidência a nível nacional e mundial é, evidentemente, uma forte comprovação de um problema que precisa ser resolvido ou no mínimo controlado, uma vez que provoca a perturbação de funções importantes do sistema estomatognático, afeta a qualidade de vida da população bem como a restrição da realização de hábitos de higiene bucal, podendo contribuir para o aparecimento de problemas de ordem oral e sistêmica (DUVAL, XAVIER et al., 2019; GOH, VICTOR, CORBET, ESMONDE F.,

LEUNG, WAI KEUNG., 2016; SAEKI, KUNIKO et. al, 2016; YAGHINI, JABER et al., 2015; ZEOLA, LIVIA FAVARO; SOARES, PAULO VINÍCIUS; CUNHA-CRUZ, JOANA, 2019; SILVA, MARKELANE SANTANA et al., 2019; RAPOSO, FERNANDA et al., 2019).

Dentre todos fatores etiológicos já citados que podem desencadear a HD, o consumo de bebidas isotônicas vem crescendo cada vez mais, principalmente dentro da área esportiva e em razão da acidez do seu pH, aumentam drasticamente o amolecimento do esmalte dentário humano (MATHEW, TANYA, CASAMASSIMO, PAUL S., HAYES, JOHN R., 2002). Nesse sentido, foi demonstrado que a profundidade da lesão do esmalte após a exposição à bebida é maior com isotônicos seguidos de energéticos e refrigerantes (EHLEN, LESLIE A. et. al, 2008).

Neste projeto foi escolhida a S.I (sabor limão, pH 2,87), que foi efetiva em desenvolver erosão dentária. Esse modelo foi baseado no trabalho descrito por BERGAMINI et al. (2014), onde foi demonstrado que a ingestão de S.I induziu erosão moderada a partir de 30 dias da ingestão e severa a partir dos 45 dias de ingestão. Nossos resultados, no entanto, demonstraram que 30 dias não foram suficientes para induzir uma resposta nociceptiva significativa, sendo então escolhido o tempo de 45 dias para nossos experimentos subsequentes.

Várias modalidades terapêuticas têm sido testadas no tratamento da HD, com graus variados de sucesso. Os *Lasers* de baixa potência têm sido amplamente investigados devido ao seu baixo custo em comparação com outros *lasers* e sua simplicidade de uso. Dentre eles, destaca-se o *laser* de Diodo Arseneto de Gálio e Alumínio (GaAIs), capaz de penetrar em tecidos moles sem causar qualquer dano térmico (pequeno aumento de temperatura de $<0,1$ °C). Muitos estudos demonstram resultados analgésicos satisfatórios em dentes com alto grau de HD (CORONA, SILMARA APARECIDA MILORI et al., 2003; LADALARDO, THEREZA CHRISTINNA CELLOS GONÇALVES PINHEIRO et al., 2004; HOJI, T., 1990).

No que se refere ao comprimento de onda, foi demonstrado que o *laser* de diodo de 660 nm foi mais efetivo que o *laser* infravermelho de 830 nm induzindo um maior nível de dessensibilização. Ainda, os efeitos terapêuticos imediatos e tardios do *laser* de diodo vermelho de 660 nm foram mais evidentes em pacientes com 25 a 35 anos de idade em comparação com os do *laser* de diodo infravermelho de 830 nm, em termos de diferentes

faixas etárias (LADALARDO, THEREZA CHRISTINNA CELLOS GONÇALVES PINHEIRO et al., 2004). Também foi demonstrada uma redução significativa da HD, tanto imediata, quanto tardia (até 60 dias) da FBM com comprimento de 808 nm (DILSIZ et al., 2010).

Nossos resultados refletem a escolha dos comprimentos de onda de 660 nm e 808 nm, pois seus efeitos biomodulatórios foram capazes de induzir a antinocicepção dos animais logo 24h após a primeira sessão e estes efeitos foram perpetuados até 14 dias após a última irradiação (gráfico 1), sugerindo uma ação prolongada dos seus efeitos antinociceptivos. Acredita-se que a FBM estimule a circulação, aumente a atividade celular, vascularização e forneçam analgesia, ação anti-inflamatória e aceleração da cicatrização tecidual. (GERSCHMAN, JA1; RUBEN, J.; GEBART-EAGLEMONT, J. 1994; DOSHI et al., 2014). No que se refere ao número de sessões, a literatura demonstra que pelo menos 3 sessões são necessárias para se tratar HD (LADALARDO et al. (2004) VIEIRA et al. (2009), LOPES et al. (2015) e com ANHESINI, BRUNNA HADDAD et al. (2018). Esses dados estão de acordo com os dados obtidos neste projeto que demonstram reversão da nocicepção a partir das primeiras 24h de tratamento (gráfico 1).

Em um importante e recente estudo conduzido por Anhesini BH e colaboradores (2018) realizou-se o tratamento com FBM (808 nm, 100 mW, 1.1 J/ponto, 10 s) em uma paciente que apresentava queixa de HD nos dentes superiores no lado direito (canino superior e primeiro pré-molar apresentando lesão cervical não cariiosa com profundidade superior a 1 mm) e esquerdo (incisivo lateral e canino apresentando desgaste mínimo). O protocolo para o lado direito foi de irradiação (sessão única) em dois pontos, seguindo da restauração com resina composta (barreira contra estímulos nocivos e restabelecimento da função e estética) e para o lado esquerdo realizou-se apenas a irradiação em três sessões.

Os resultados foram que ambos os casos houve analgesia de maneira satisfatória, pois ao utilizar a escala visual analógica (0,0-10,0) como método de avaliação da dor, verificou-se uma diminuição de 9,4 para 0,0 (lado direito) e 5,4 para 2,0 após 3 sessões (lado esquerdo) (ANHESINI, BRUNNA HADDAD et al., 2018). Uma forte evidência de que a FBM, além de atuar como uma terapia complementar a outras já existentes, pode ser, seguramente, usada como a primeira escolha no tratamento da HD, caso sejam

respeitados os procedimentos prévios como diagnóstico e escolha dos parâmetros adequados.

Sabe-se que todas as condições patológicas que causem danos aos tecidos bucais, assim como as de caráter não patológico (como por exemplo procedimentos odontológicos de rotina e hábitos alimentares) aumentam a produção e a liberação de SP (SACERDOTE, PAOLA; LEVRINI, LUCA., 2012). É de suma importância salientar que este neuropeptídeo é um potente imunoestimulador com a capacidade de sustentar o processo inflamatório (KIM, SYNGCUK., 1990; CAVIEDES-BUCHELI, JAVIER et al., 2008 [A]), pois o aumento dos seus níveis eleva a quimiotaxia de macrófagos, neutrófilos e atividade mitogênica dos linfócitos. Caso não haja um controle desse processo, o tecido pulpar estará sujeito a sofrer um processo degenerativo com posterior necrose (O'CONNOR, TERENCE M. et al., 2004; YAMAGUCHI, M. et al., 2004). Nesse sentido, foi demonstrada a expressão de SP frente ao trauma oclusal induzido experimentalmente em polpas dentárias humanas sadias e no ligamento periodontal (CAVIEDES-BUCHELI, JAVIER et al., 2011). Esses autores demonstraram um aumento de 45% na polpa dentária e 120% no ligamento periodontal, reforçando a hipótese que a presença de mediadores inflamatórios induzidos pelo aumento de SP provoca um desequilíbrio dos mecanismos reguladores do remodelamento ósseo e da matriz extracelular (MCDEVITT, MICHAEL J. et al., 2003; SODEYAMA, T. et al., 1996), visto que o tratamento com antiinflamatórios pode induzir a sua diminuição (BAMINI, LAVANYA et al., 2019).

Embora os achados acima citados sejam baseados em modelos inflamatórios distintos do modelo aqui aplicado, a HD também é uma condição agressiva que gera uma resposta inflamatória no tecido pulpar, acompanhado de uma maior expressividade de SP (CAVIEDES-BUCHELI, JAVIER et al., 2011). A ED, como já comentada, resulta na perda do esmalte (MATHEW, TANYA, CASAMASSIMO, PAUL S., HAYES, JOHN R., 2002), deixando os prolongamentos odontoblásticos e os terminais nociceptivos sujeitos a estimulação contínua, sendo a dor, o sintoma mais clássico frente esse processo (PORTO, ISABEL CCM; ANDRADE, ANA KM; MONTES, MARCOS AJR., 2009; A. SOLÉ MAGDALENA et al., 2018).

No que se refere ao tratamento por FBM, foi demonstrado diminuição dos níveis de SP no nervo alveolar de ratos submetidos a um modelo experimental de injúria do

nervo trigêmeo (MARTINS, D. O. et al., 2017). Esses achados corroboram os nossos resultados, pois embora a lesão do nervo alveolar inferior seja uma condição com um maior grau de agressividade, tem potencial, da mesma forma que a HD, de criar um ambiente inflamatório. O aumento da expressão de SP observado nos molares dos animais após a ingestão de solução isotônica, reforça estes dados.

Ainda, os resultados aqui apresentados demonstram que a FBM (660 nm e 808 nm) induziu uma diminuição da imunoreatividade de SP (gráfico 2 e figura 2) bem como a nocicepção 24 horas após o protocolo de 3 sessões consecutivas (gráfico 1), mostrando que a utilização dos parâmetros adequados pode gerar um efeito analgésico imeditado em razão do estímulo de funções celulares (CORONA, SILMARA APARECIDA MILORI et al., 2003). A maneira como essa modalidade terapêutica pode atuar modificando a transmissão dos impulsos nervosos no tecido pulpar (WAKABAYASHI, HAJIME et al. 1993), minimizando a dor e inflamação (KARU, TIINA et al., 1989) são evidências que dão credibilidade e transparência ao nosso projeto.

A OPN pode se ligar a certas integrinas ($\alpha\beta3$, $\alpha\beta1$, $\alpha\beta5$, $\alpha\beta6$, $\alpha5\beta1$ e $\alpha8\beta1$) por meio do motivo RGD de ligação a integrina (Arg-Gly-Asp) para regular processos fisiológicos e patológicos, como por exemplo a inflamação e respostas imunes (PAGEL, CHARLES N. et al., 2014). Evidências indicam que a sua deficiência altera o processo regenerativo em resposta a lesão na pele (LIAW, LUCY et al., 1998). Esses achados foram sustentados anteriormente onde, após a injeção de OPN, houve um aumento do infiltrado de macrófagos (SINGH, RAJESH P. et al., 1990), nos levando a crer que esta glicoproteína atua como uma molécula quimioatrativa (WEBER, GEORG F., CANTOR, HARVEY, 1996) e reguladora das funções de células imunocompetentes (LAMPE, MARILYN A. et al., 1991).

Com relação ao seu papel no complexo dentino-pulpar, a OPN foi detectada na dentina e na fronteira entre a DT e a preexistente em ratos (MOSES, KYLE D., BUTLER, WILLIAM T., QIN, CHUNLIN, 2006; TAKAMORI, YASUHIKO et al., 2008). Dados recentes da literatura demonstram que células imunocompetentes, como macrófagos secretam OPN e que a mesma é depositada na interface dentina / pré-dentina antes da diferenciação celular tipo odontoblasto após o transplante de dente. Esses achados

sugerem que a OPN desempenha um papel na diferenciação de células semelhantes a odontoblastos, células essas responsáveis pela produção de DT (SAITO, K et al., 2016).

A FBM é capaz de aumentar a atividade metabólica de células semelhantes a odontoblastos e promover a produção aumentada de DT, obliterando os túbulos dentinários (MACHADO, ALANA CRISTINA et al., 2018). Baseado nisso, nossos dados sugerem que esta modalidade terapêutica pode atuar bioestimulando esses grupos celulares a não apenas produzir DT, mas também a produzir OPN, uma vez que células putativas semelhantes a odontoblastos e / ou imunocompetentes podem expressar e depositar OPN na borda da polpa dentária para induzir a formação de DT. Foi também demonstrado, em ensaio *in vitro*, que células do tipo odontoblasto cultivadas expressam OPN. Assim, é razoável supor que células imaturas semelhantes a odontoblastos e / ou células imunocompetentes, tais como macrófagos, secretam OPN (SAITO, K et al., 2016; CHEN, Shuo et al., 2008; SEMEGHINI et al. 2012). Esses autores também demonstraram que animais OPN knockout (KO) apresentam tempo de proliferação celular ativa diferente dos animais selvagens. Esses achados indicam que a cicatrização pulpar, incluindo a proliferação celular, foi retardada devido à reação inflamatória prejudicada nos camundongos OPN KO (SAITO, K et al., 2016). Esse fenômeno coincide com os achados de que a deficiência do OPN retarda a infiltração inflamatória na lesão muscular (UAESOONTRACHOON et al. 2013) e a vascularização precoce na consolidação da fratura óssea (DUVALL, Craig L. et al., 2007).

Demonstramos que ambos os grupos (S.I + FBM 660 nm e S.I + FBM 808 nm) sofreram efeito antinociceptivo quando avaliados 14 dias (gráfico 1) após o protocolo de três aplicações consecutivas, resultando no aumento significativo na imunoreatividade de OPN (gráfico 3 e figura 3). Acredita-se que o comprimento de onda de 660 nm têm uma forte relação com os odontoblastos, uma vez que os mesmos se encontram dispostos em camadas superficiais no complexo dentino-pulpar (SLOAN, ALASTAIR J., 2015). Logo, sugere-se que a analgesia observada é consequência da ação obliteradora pelo aumento da atividade celular, culminando na produção de tecido dentinário neoformado e migração odontoblástica em resposta a OPN presente.

A capacidade do comprimento de onda de 808 nm em atingir áreas mais profundas (HAMBLIN, MICHAEL R.; DEMIDOVA, TATIANA N., 2019) podendo atuar nos terminais

nociceptivos e camada subodontoblástica (SLOAN, ALASTAIR J., 2015) são dados que corroboram nossos achados, pois a antinocicepção é consequência de efeitos mitocondriais provocando mudanças na transmissão dos impulsos neurais e sinalização celular levando ao controle da neuroinflamação (MACHADO, ALANA CRISTINA et al., 2018). A respeito do aumento da imunoreatividade de OPN também observado nesse comprimento de onda, sugere-se que o mesmo esteja atuando induzindo a síntese e secreção de ATP nos terminais nociceptivos, gerando um efeito regenerativo pela ativação da atividade dos odontoblastos, em razão dos mesmos possuírem receptores específicos para tal substância (A. SOLÉ MAGDALENA et al., 2018).

No GT, as CGS têm uma relação bioquímica íntima com os corpos neuronais que estão ao seu redor (HANANI, MENACHEM, 2005), sendo, até então, um dos principais focos de pesquisas na área da dor (COSTA, FILIPA ALEXANDRA LEITE; MOREIRA NETO, FANI LOURENÇA, 2015). Nossos resultados demonstram um aumento significativo nos níveis imunorreativos de SP nos neurônios do GT (gráfico 4 e figura 4) de animais com erosão dentária, sugerindo uma contribuição efetiva desse neuropeptídeo na gênese e manutenção da inflamação neurogênica. A literatura corrobora os dados aqui apresentados, pois sabe-se que o estímulo nociceptivo induz a síntese e liberação de SP pelos neurônios no interior do GT. A sinalização parácrina de SP com seus receptores na superfície do CGS induz a síntese e liberação de citocinas pró-inflamatórias como TNF α (fator de necrose tumoral alfa) e IL-1 β (interleucina 1 beta), que por sua vez, possuem impacto direto na excitabilidade neural através de receptores específicos (TAKEDA, MAMORU; TAKAHASHI, MASAYUKI; MATSUMOTO, SHIGEJI, 2009).

Em condições basais, as CGS exibem baixos níveis de GFAP (proteína glial fibrilar ácida) (um marcador essencial na avaliação de sua ativação) quase indetectável por imuno-histoquímica (COSTA, FILIPA ALEXANDRA LEITE; MOREIRA NETO, FANI LOURENÇA, 2015). Os dados expostos aqui corroboram os achados da literatura, pois animais com erosão dentária exibiram uma imunomarcção GFAP significativamente aumentada (gráfico 5 e figura 5), sugerindo que a aferência nociceptiva periférica induziu ativação neuronal no GT. Estudos que demonstraram um aumento na expressão desse marcador após lesão reforçam nossos achados (VIT, JEAN-PHILIPPE et al., 2006).

O tratamento com FBM induziu significativamente a imunorreatividade em menor escala em ambos os comprimentos de onda (660 nm e 808 nm) (gráfico 5 e figura 5), sugerindo que a antinocicepção exibida pelos animais é o resultado do bloqueio da transmissão elétrica periférica (MACHADO, ALANA CRISTINA et al., 2018), culminando em menor atividade do SGC como resultado de a diminuição na síntese e liberação de SP.

Em nosso modelo experimental tivemos a oportunidade de trabalhar com dois comprimentos de onda distintos (660 nm e 808 nm) com objetivo de investigar os efeitos e mecanismos moleculares a eles relacionados no tratamento HD. Salientamos que a justificativa de tal escolha provém do fato (já muito estabelecido na comunidade de estudiosos em FBM) de que comprimentos de ondas diferentes geram respostas diferentes, ou seja, os que estão na faixa de 600-700 nm são escolhidos para regiões mais superficiais e na faixa de 780-950 nm para regiões mais profundas (HAMBLIN, MICHAEL R.; DEMIDOVA, TATIANA N., 2019).

7 CONCLUSÕES

Em suma, os resultados alcançados demonstram que o tratamento com FBM (660 nm e 808 nm) induz antinocicepção em ratos por mecanismos que envolvem diminuição da imunoreatividade de SP, GFAP e aumento da imunoreatividade OPN no modelo experimental de HD sem gerar efeitos adversos. Nossos dados garantem, comprovam e credibilizam a eficiência desta modalidade terapêutica em promover ação bioestimulatória acompanhada de efeitos antiinflamatórios e analgésicos. Efeitos esses indispensáveis, que garantem uma melhor qualidade de vida em pacientes que possuem HD.

8 REFERÊNCIAS*

ALLARD, Bruno et al. Voltage-gated sodium channels confer excitability to human odontoblasts possible role in tooth pain transmission. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 39, p. 29002-29010, 2006.

ALMUSHAYT, A. et al. Dentin matrix protein 1 induces cytodifferentiation of dental pulp stem cells into odontoblasts. **Gene therapy**, v. 13, n. 7, p. 611, 2006.

AMIR, R.; DEVOR, M. Functional cross-excitation between afferent A-and C-neurons in dorsal root ganglia. **Neuroscience**, v. 95, n. 1, p. 189-195, 1999.

AMIR, Ron; DEVOR, Marshall. Chemically mediated cross-excitation in rat dorsal root ganglia. **Journal of Neuroscience**, v. 16, n. 15, p. 4733-4741, 1996.

ANHESINI, Brunna Haddad et al. Photobiomodulation versus direct restoration in a patient presenting with dentinal hypersensitivity: a 6-month follow-up. **General dentistry**, v. 66, n. 2, p. 69-73, 2018.

ARANA-CHAVEZ, Victor E.; MASSA, Luciana F. Odontoblasts: the cells forming and maintaining dentine. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 36, n. 8, p. 1367-1373, 2004.

ARANY, Praveen R. et al. Photoactivation of endogenous latent transforming growth factor- β 1 directs dental stem cell differentiation for regeneration. **Science translational medicine**, v. 6, n. 238, p. 238ra69-238ra69, 2014.

AWAWDEH, Lama A. et al. Quantitative analysis of substance P, neurokinin A and calcitonin gene-related peptide in gingival crevicular fluid associated with painful human teeth. **European journal of oral sciences**, v. 110, n. 3, p. 185-191, 2002.

BAMINI, Lavanya et al. Influence of anti-inflammatory irrigant on substance P expression for single-visit root canal treatment of teeth with irreversible pulpitis. **Australian Endodontic Journal**, 2019.

BARON, Anne; LINGUEGLIA, Eric. Pharmacology of acid-sensing ion channels- Physiological and therapeutical perspectives. **Neuropharmacology**, v. 94, p. 19-35, 2015.

BARTLETT, David. A new look at erosive tooth wear in elderly people. **The Journal of the American Dental Association**, v. 138, p. S21-S25, 2007.

BEGUE-KIRN, CATHERINE et al. Effects of dentin proteins, transforming growth factor beta 1 (TGF beta 1) and bone morphogenetic protein 2 (BMP2) on the differentiation of odontoblast in vitro. **International Journal of Developmental Biology**, v. 36, n. 4, p. 491-503, 2004.

BELLAHCENE, Akeila et al. Bone sialoprotein mediates human endothelial cell attachment and migration and promotes angiogenesis. **Circulation research**, v. 86, n. 8, p. 885-891, 2000.

BERGAMINI, Marcelo R. et al. Dentin hypersensitivity induces anxiety and increases corticosterone serum levels in rats. **Life sciences**, v. 98, n. 2, p. 96-102, 2014.

BEVENIUS, Joan; LINDSKOG, Sven; HULTENBY, Kjell. The micromorphology in vivo of the buccocervical region of premolar teeth in young adults: a replica study by scanning electron microscopy. **Acta Odontologica Scandinavica**, v. 52, n. 6, p. 323-334, 1994

BRÄNNSTRÖM, M.; JOHNSON, Gunilla; NORDENVALL, Karl-Johan. Transmission and control of dentinal pain: resin impregnation for the desensitization of dentin. **Journal of the American Dental Association (1939)**, v. 99, n. 4, p. 612-618, 1979.

BRÖNNIMANN, Ben VE et al. Dentin hypersensitivity monitored by cold air quantitative sensory testing. **Journal of oral rehabilitation**, v. 46, n. 6, p. 549-555, 2019.

BYERS, M. R.; NARHI, M. V. O. Dental injury models: experimental tools for understanding neuroinflammatory interactions and polymodal nociceptor functions. **Critical Reviews in Oral Biology & Medicine**, v. 10, n. 1, p. 4-39, 1999.

BYERS, Margaret R.; WESTENBROEK, Ruth E. Odontoblasts in developing, mature and ageing rat teeth have multiple phenotypes that variably express all nine voltage-gated sodium channels. **Archives of oral biology**, v. 56, n. 11, p. 1199-1220, 2011.

CARDA, C.; PEYDRO, A. Ultrastructural patterns of human dentinal tubules, odontoblasts processes and nerve fibres. **Tissue and Cell**, v. 38, n. 2, p. 141-150, 2006.

CARDOSO, A. C. Atlas clínica da corrosão do esmalte e da dentina. Ed. **Quintessence**, p. 28, 2007.

CAVIEDES-BUCHELI, Javier et al. Effect of experimentally induced occlusal trauma on substance P expression in human dental pulp and periodontal ligament. **Journal of Endodontics**, v. 37, n. 5, p. 627-630, 2011.

CAVIEDES-BUCHELI, Javier et al. Neuropeptides in dental pulp: the silent protagonists. **Journal of endodontics**, v. 34, n. 7, p. 773-788, 2008 [A].

CAVIEDES-BUCHELI, Javier et al. The effect of different vasoconstrictors and local anesthetic solutions on substance P expression in human dental pulp. **Journal of Endodontics**, v. 35, n. 5, p. 631-633, 2009.

CAVIEDES-BUCHELI, Javier et al. The effect of tooth bleaching on substance P expression in human dental pulp. **Journal of Endodontics**, v. 34, n. 12, p. 1462-1465, 2008 [B].

CERUTI, Stefania et al. Purinoceptor-mediated calcium signaling in primary neuron-glia trigeminal cultures. **Cell calcium**, v. 43, n. 6, p. 576-590, 2008.

CHEN, C. L. et al. Comparative evaluation of the effectiveness of desensitizing agents in dentine tubule occlusion using scanning electron microscopy. **Australian dental journal**, v. 60, n. 1, p. 65-72, 2015.

CHEN, Shuibing et al. Reversine increases the plasticity of lineage-committed mammalian cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 25, p. 10482-10487, 2007.

CHENG, Jen-Kun; JI, Ru-Rong. Intracellular signaling in primary sensory neurons and persistent pain. **Neurochemical research**, v. 33, n. 10, p. 1970-1978, 2008.

CHERKAS, Pavel S. et al. The effects of axotomy on neurons and satellite glial cells in mouse trigeminal ganglion. **Pain**, v. 110, n. 1-2, p. 290-298, 2004.

CHICHORRO, Juliana Geremias; PORRECA, Frank; SESSLE, Barry. Mechanisms of craniofacial pain. **Cephalalgia**, v. 37, n. 7, p. 613-626, 2017.

CORONA, Silmara Aparecida Milori et al. Clinical evaluation of low-level laser therapy and fluoride varnish for treating cervical dentinal hypersensitivity. **Journal of Oral Rehabilitation**, v. 30, n. 12, p. 1183-1189, 2003.

COSTA, Filipa Alexandra Leite; MOREIRA NETO, Fani Lourença. Satellite glial cells in sensory ganglia: its role in pain. **Revista brasileira de anestesiologia**, v. 65, n. 1, p. 73-81, 2015.

COUTAUX, Anne et al. Hyperalgesia and allodynia: peripheral mechanisms. **Joint Bone Spine**, v. 72, n. 5, p. 359-371, 2005.

CUMMINS, Diane. Recent advances in dentin hypersensitivity: clinically proven treatments for instant and lasting sensitivity relief. **American Journal of Dentistry**, v. 23, p. 3A, 2010.

DE SOUSA, Lindoaldo Xavier et al. Abfração dentária: um enfoque sobre a etiologia e o tratamento restaurador. **ARCHIVES OF HEALTH INVESTIGATION**, v. 7, n. 2, 2018.

DILSIZ, Alparslan et al. Clinical evaluation of Er: YAG, Nd: YAG, and diode laser therapy for desensitization of teeth with gingival recession. **Photomedicine and laser surgery**, v. 28, n. S2, p. S-11-S-17, 2010.

DOSHI, Shreya; JAIN, Sanjay; HEGDE, Rashmi. Effect of low-level laser therapy in reducing dentinal hypersensitivity and pain following periodontal flap surgery. **Photomedicine and laser surgery**, v. 32, n. 12, p. 700-706, 2014.

DOUGLAS-DE-OLIVEIRA, Dhelfeson Willya et al. Effect of dentin hypersensitivity treatment on oral health related quality of life—A systematic review and meta-analysis. **Journal of dentistry**, v. 71, p. 1-8, 2018.

DUBNER, Ronald; BENNETT, Gary J. Spinal and trigeminal mechanisms of nociception. **Annual review of neuroscience**, v. 6, n. 1, p. 381-418, 1983.

DUVALL, Craig L. et al. Impaired angiogenesis, early callus formation, and late stage remodeling in fracture healing of osteopontin-deficient mice. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 22, n. 2, p. 286-297, 2007.

DUVAL, Xavier et al. Prévention de l'endocardite infectieuse. **La Presse Médicale**, v. 48, n. 5, p. 556-562, 2019.

EHLEN, Leslie A. et al. Acidic beverages increase the risk of in vitro tooth erosion. **Nutrition Research**, v. 28, n. 5, p. 299-303, 2008.

ESTEVEZ-OLIVEIRA, M. et al. CO₂ laser (10.6 μm) parameters for caries prevention in dental enamel. **Caries research**, v. 43, n. 4, p. 261-268, 2009.

FERREIRA, Adriana Nayme Segovia et al. Effect of GaAIs laser on reactional dentinogenesis induction in human teeth. **Photomedicine and Laser Therapy**, v. 24, n. 3, p. 358-365, 2006.

FISHER, L. W. et al. Flexible structures of SIBLING proteins, bone sialoprotein, and osteopontin. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 280, n. 2, p. 460-465, 2001.

FRISTAD, I. et al. NK1, NK2, NK3 and CGRP1 receptors identified in rat oral soft tissues, and in bone and dental hard tissue cells. **Cell and tissue research**, v. 311, n. 3, p. 383-391, 2003.

GEDALIA, I. et al. The effect of fluoride and strontium application on dentin: in vivo and in vitro studies. **Journal of periodontology**, v. 49, n. 5, p. 269-272, 1978.

GERSCHMAN, JA1; RUBEN, J.; GEBART-EAGLEMONT, J. Low level laser therapy for dentinal tooth hypersensitivity. **Australian Dental Journal**, v. 39, n. 6, p. 353-357, 1994.

GILLAM, D. G.; ORCHARDSON, R. Advances in the treatment of root dentine sensitivity: mechanisms and treatment principles. **Endodontic Topics**, v. 13, n. 1, p. 13-33, 2006.

GOH, Victor; CORBET, Esmonde F.; LEUNG, Wai Keung. Impact of dentine hypersensitivity on oral health-related quality of life in individuals receiving supportive periodontal care. **Journal of clinical periodontology**, v. 43, n. 7, p. 595-602, 2016.

GOW, Alex M.; KELLEHER, Martin GD. Tooth surface floss loss: Unusual interproximal and lingual cervical lesions as a result of bizarre dental flossing. **Dental Update**, v. 30, n. 6, p. 331-336, 2003.

GU, Yanping et al. Neuronal soma–satellite glial cell interactions in sensory ganglia and the participation of purinergic receptors. **Neuron glia biology**, v. 6, n. 1, p. 53-62, 2010.

HAMBLIN, Michael R.; DEMIDOVA, Tatiana N. Mechanisms of low level light therapy. In: **Mechanisms for low-light therapy**. International Society for Optics and Photonics, 2019. p. 614001.

HANANI, M. et al. Glial cell plasticity in sensory ganglia induced by nerve damage. **Neuroscience**, v. 114, n. 2, p. 279-283, 2002.

HANANI, Menachem. Satellite glial cells in sensory ganglia: from form to function. **Brain research reviews**, v. 48, n. 3, p. 457-476, 2005.

HANANI, Menachem. Satellite glial cells: more than just 'rings around the neuron'. **Neuron glia biology**, v. 6, n. 1, p. 1-2, 2010.

HARADA, Fumiko et al. The involvement of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in the regeneration of periodontal Ruffini endings following transection of the inferior alveolar nerve. **Archives of histology and cytology**, v. 66, n. 2, p. 183-194, 2003.

HARRISON, Selena; GEPPETTI, Pierangelo. Substance p. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 33, n. 6, p. 555-576, 2001.

HOJI, T. Effects of soft laser irradiation on dentinal pain. **Gifu Shika Gakkai zasshi= The Journal of Gifu Dental Society**, v. 17, n. 2, p. 534-546, 1990.

HOLLAND, GR1 et al. Guidelines for the design and conduct of clinical trials on dentine hypersensitivity. **Journal of clinical periodontology**, v. 24, n. 11, p. 808-813, 1997.

HOLZER, Peter; IZZO, Angelo A. The pharmacology of TRP channels. **British journal of pharmacology**, v. 171, n. 10, p. 2469-2473, 2014.

HOLZER, Peter. Acid-sensitive ion channels and receptors. In: **Sensory Nerves**. Springer, Berlin, Heidelberg, 2009. p. 283-332.

HUANG, L.-YM; NEHER, E. Ca²⁺-dependent exocytosis in the somata of dorsal root ganglion neurons. **Neuron**, v. 17, n. 1, p. 135-145, 1996.

HUANG, Ying-Ying et al. Biphasic dose response in low level light therapy. **Dose-response**, v. 7, n. 4, p. dose-response. 09-027. Hamblin, 2009.

HUCHO, Tim; LEVINE, Jon D. Signaling pathways in sensitization: toward a nociceptor cell biology. **Neuron**, v. 55, n. 3, p. 365-376, 2007.

IWATA, Koichi et al. Physiological mechanisms of neuropathic pain: the orofacial region. In: **International review of neurobiology**. Academic Press, 2011. p. 227-250.

JATI, Ana Suzy; FURQUIM, Laurindo Zanco; CONSOLARO, Alberto. Gingival recession: its causes and types, and the importance of orthodontic treatment. **Dental press journal of orthodontics**, v. 21, n. 3, p. 18-29, 2016.

JESSEN, Kristjan R.; MIRSKY, Rhona. The origin and development of glial cells in peripheral nerves. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 6, n. 9, p. 671, 2005.

JULIUS, David; BASBAUM, Allan I. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**, v. 413, n. 6852, p. 203, 2001.

KANDEL, Eric et al. **Princípios de Neurociências-5**. AMGH Editora, 2014.

KARU, Tiina et al. Photobiology of low-power laser effects. **Health phys**, v. 56, n. 5, p. 691-704, 1989.

KARU, Tiina I. Multiple roles of cytochrome c oxidase in mammalian cells under action of red and IR-A radiation. **IUBMB life**, v. 62, n. 8, p. 607-610, 2010.

KARU, Tiina. Laser biostimulation: a photobiological phenomenon. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 3, n. 4, p. 638, 1989.

KATCHBURIAN, Eduardo; ARANA, Victor. Histologia e embriologia oral. In: **Histologia e embriologia oral**. 2017.

KAWASHIMA, Nobuyuki; OKIJI, Takashi. Odontoblasts: Specialized hard-tissue-forming cells in the dentin-pulp complex. **Congenital anomalies**, v. 56, n. 4, p. 144-153, 2016.

KIM, Syngcuk. Neurovascular interactions in the dental pulp in health and inflammation. **Journal of endodontics**, v. 16, n. 2, p. 48-53, 1990.

KIMURA, Yuichi et al. Treatment of dentine hypersensitivity by lasers: a review. **Journal of Clinical Periodontology: Review article**, v. 27, n. 10, p. 715-721, 2000.

KOBAYASHI, Ieyoshi et al. Type II/III Runx2/Cbfa1 is required for tooth germ development. **Bone**, v. 38, n. 6, p. 836-844, 2006.

LADALARDO, Thereza Christinna Cellos Gonçalves Pinheiro et al. Laser therapy in the treatment of dentine hypersensitivity. **Brazilian dental journal**, v. 15, n. 2, p. 144-150, 2004.

LAMPE, MARILYN A. et al. Polyclonal B cell activation by the Eta-1 cytokine and the development of systemic autoimmune disease. **The Journal of Immunology**, v. 147, n. 9, p. 2902-2906, 1991.

LEE, Yoon; CHUNG, Won-Gyun. Management of dentin hypersensitivity. **J Korean Academy Endodontics**, v. 12, n. 2, p. 12-6, 2011.

LI, Jing; VAUSE, Carrie V.; DURHAM, Paul L. Calcitonin gene-related peptide stimulation of nitric oxide synthesis and release from trigeminal ganglion glial cells. **Brain research**, v. 1196, p. 22-32, 2008.

LI, Man et al. Effects of complete Freund's adjuvant on immunohistochemical distribution of IL-1 β and IL-1R I in neurons and glia cells of dorsal root ganglion 1. **Acta pharmacologica Sinica**, v. 26, n. 2, p. 192-198, 2005.

LIAW, Lucy et al. Altered wound healing in mice lacking a functional osteopontin gene (spp1). **The Journal of clinical investigation**, v. 101, n. 7, p. 1468-1478, 1998.

LINGUEGLIA, Eric. Acid-sensing ion channels in sensory perception. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 24, p. 17325-17329, 2007.

LONE, A. et al. Clinical evaluation of the role of glutardialdehyde in a one-bottle adhesive. **American Journal of Dentistry**, v. 15, n. 5, p. 330-334, 2002.

LOPES, Anely Oliveira; DE PAULA EDUARDO, Carlos; ARANHA, Ana Cecília Correa. Clinical evaluation of low-power laser and a desensitizing agent on dentin hypersensitivity. **Lasers in medical science**, v. 30, n. 2, p. 823-829, 2015.

LULZ, Ana Paula et al. The role of Nav1. 9 channel in the development of neuropathic orofacial pain associated with trigeminal neuralgia. **Molecular pain**, v. 11, p. s12990-015-0076-4, 2015.

MACHADO, Alana Cristina et al. **Lasers in medical science**, v. 33, n. 4, p. 745-753, 2018.

MAGGI, Carlo Alberto. Tachykinins and calcitonin gene-related peptide (CGRP) as co-transmitters released from peripheral endings of sensory nerves. **Progress in neurobiology**, v. 45, n. 1, p. 1-98, 1995.

MAGLOIRE, Henry et al. Topical review. Dental pain and odontoblasts: facts and hypotheses. **Journal of orofacial pain**, v. 24, n. 4, p. 335, 2010.

MARRIOTT, Ian. The role of tachykinins in central nervous system inflammatory responses. **Front Biosci**, v. 9, n. 2153, p. 65, 2004.

MARTINS, D. O. et al. Neurochemical effects of photobiostimulation in the trigeminal ganglion after inferior alveolar nerve injury. **Journal of biological regulators and homeostatic agents**, v. 31, n. 1, p. 147-152, 2017.

MATHEW, Tanya; CASAMASSIMO, Paul S.; HAYES, John R. Relationship between sports drinks and dental erosion in 304 university athletes in Columbus, Ohio, USA. **Caries research**, v. 36, n. 4, p. 281-287, 2002.

MATSUKA, Yoshizo et al. Concurrent release of ATP and substance P within guinea pig trigeminal ganglia in vivo. **Brain research**, v. 915, n. 2, p. 248-255, 2001.

MAYOR, Roberto; THEVENEAU, Eric. The neural crest. **Development**, v. 140, n. 11, p. 2247-2251, 2013.

MCDEVITT, Michael J. et al. Impact of Increased Occlusal Contact, Interleukin-1 Genotype, and Periodontitis Severity on Gingival Crevicular Fluid IL-1 β Levels. **Journal of periodontology**, v. 74, n. 9, p. 1302-1307, 2003.

MCMAHON, Stephen B.; MALCANGIO, Marzia. Current challenges in glia-pain biology. **Neuron**, v. 64, n. 1, p. 46-54, 2009.

MIGLANI, Sanjay; AGGARWAL, Vivek; AHUJA, Bhoomika. Dentin hypersensitivity: Recent trends in management. **Journal of conservative dentistry: JCD**, v. 13, n. 4, p. 218, 2010.

MILLSON, David; TEPPER, Stewart. Scholz J, Woolf CJ. Can we conquer pain? *Nat Neurosci.* 2002; 5 (suppl) 1062–1067. **Headache**, v. 43, n. 6, 2003.

MILOSEVIC, Alex. Abrasion: A common dental problem revisited. **Primary Dental Journal**, v. 6, n. 1, p. 32-36, 2017.

MINOUX, Maryline; SERFATY, Rene. Vital tooth bleaching: Biologic adverse effects—A review. **Quintessence international**, v. 39, n. 8, 2008.

MORIARTY, Derek et al. Potent NK1 antagonism by SR-140333 reduces rat colonic secretory response to immunocyte activation. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 280, n. 4, p. C852-C858, 2001.

MORRIS, M. F.; DAVIS, R. D.; RICHARDSON, B. W. Clinical efficacy of two dentin desensitizing agents. **American journal of dentistry**, v. 12, n. 2, p. 72-76, 1999.

MOSES, Kyle D.; BUTLER, William T.; QIN, Chunlin. Immunohistochemical study of small integrin-binding ligand, N-linked glycoproteins in reactionary dentin of rat molars at different ages. **European journal of oral sciences**, v. 114, n. 3, p. 216-222, 2006.

Nancy A. Dentin-pulp complex. In: Nancy A, editor. Ten Cate's Oral Histology Development, Structure, and Function, 6th edn. St Louis, USA: Mosby; 2003. p. 192–239.

NARAYANAN, Karthikeyan et al. Differentiation of embryonic mesenchymal cells to odontoblast-like cells by overexpression of dentin matrix protein 1. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 8, p. 4516-4521, 2001.

NEUBERT, John K. et al. Inflammation-induced changes in primary afferent-evoked release of substance P within trigeminal ganglia in vivo. **Brain research**, v. 871, n. 2, p. 181-191, 2000.

NILIUS, Bernd; OWSIANIK, Grzegorz. The transient receptor potential family of ion channels. **Genome biology**, v. 12, n. 3, p. 218, 2011.

NILIUS, Bernd; SZALLASI, Arpad. Transient receptor potential channels as drug targets: from the science of basic research to the art of medicine. **Pharmacological reviews**, v. 66, n. 3, p. 676-814, 2014.

O'CONNOR, Terence M. et al. The role of substance P in inflammatory disease. **Journal of cellular physiology**, v. 201, n. 2, p. 167-180, 2004.

OMERBAŠIĆ, Damir et al. ASICs and mammalian mechanoreceptor function. **Neuropharmacology**, v. 94, p. 80-86, 2015.

ORCHARDSON, Robin; GILLAM, David G. Managing dentin hypersensitivity. **The Journal of the American Dental Association**, v. 137, n. 7, p. 990-998, 2006.

OSTROWSKA, Aneta et al. Evaluation of the erosive potential of selected isotonic drinks: in vitro studies. **Advances in Clinical and Experimental Medicine**, v. 25, n. 6, p. 1313-1319, 2016.

PAGEL, Charles N. et al. Osteopontin, inflammation and myogenesis: influencing regeneration, fibrosis and size of skeletal muscle. **Journal of cell communication and signaling**, v. 8, n. 2, p. 95-103, 2014.

Pannese E. The satellite cells of the sensory ganglia. **Adv Anat Embryol Cell Biol.** 1981; 65:1-111.

PANNESE, E. et al. Age-related reduction of the satellite cell sheath around spinal ganglion neurons in the rabbit. **Journal of neurocytology**, v. 25, n. 1, p. 137-146, 1996.

PANNESE, E. et al. Clusters of nerve cell bodies enclosed within a common connective tissue envelope in the spinal ganglia of the lizard and rat. **Cell and tissue research**, v. 264, n. 2, p. 209-214, 1991.

PANNESE, Ennio. The structure of the perineuronal sheath of satellite glial cells (SGCs) in sensory ganglia. **Neuron glia biology**, v. 6, n. 1, p. 3-10, 2010.

PASSARELLA, Salvatore; KARU, Tiina. Absorption of monochromatic and narrow band radiation in the visible and near IR by both mitochondrial and non-mitochondrial photoacceptors results in photobiomodulation. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 140, p. 344-358, 2014.

PILLON, Flávio L.; ROMANI, Ingrid G.; SCHMIDT, Édina R. Effect of a 3% potassium oxalate topical application on dentinal hypersensitivity after subgingival scaling and root planing. **Journal of periodontology**, v. 75, n. 11, p. 1461-1464, 2004.

PORTO, Isabel CCM; ANDRADE, Ana KM; MONTES, Marcos AJR. Diagnosis and treatment of dentinal hypersensitivity. **Journal of oral science**, v. 51, n. 3, p. 323-332, 2009.

QIN, Chunlin; BABA, Otto; BUTLER, W. T. Post-translational modifications of sibling proteins and their roles in osteogenesis and dentinogenesis. **Critical Reviews in Oral Biology & Medicine**, v. 15, n. 3, p. 126-136, 2004.

RANJAN, Rajeev et al. Efficacy of 980 nm diode laser as an adjunct to Snf 2 in the management of dentinal hypersensitivity: A controlled, prospective clinical study. **Journal of Dental Lasers**, v. 7, n. 2, p. 66, 2013.

RAPOSO, Fernanda et al. Prevalence of Hypersensitivity in Teeth Affected by Molar-Incisor Hypomineralization (MIH). **Caries research**, v. 53, n. 4, p. 424-430, 2019.

REES, J. S.; ADDY, M. A cross-sectional study of buccal cervical sensitivity in UK general dental practice and a summary review of prevalence studies. **International journal of dental hygiene**, v. 2, n. 2, p. 64-69, 2004.

RICHARDSON, Jennelle Durnett; VASKO, Michael R. Cellular mechanisms of neurogenic inflammation. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 302, n. 3, p. 839-845, 2002.

RODD, Helen D.; BOISSONADE, Fiona M. Substance P expression in human tooth pulp in relation to caries and pain experience. **European Journal of Oral Sciences**, v. 108, n. 6, p. 467-474, 2000.

RODRIGUEZ, Nancy R.; DIMARCO, Nancy M.; LANGLEY, Susie. Position of the American Dietetic Association, Dietitians of Canada, and the American College of Sports Medicine: Nutrition and athletic performance. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 109, n. 3, p. 509-527, 2009.

SABERI, Sogol et al. Evaluation of Tooth Surface Irradiated With Erbium: Yttrium Aluminum Garnet and Carbon Dioxide Lasers by Atomic Force Microscopy. **Journal of lasers in medical sciences**, v. 9, n. 3, p. 188, 2018.

SACERDOTE, Paola; LEVRINI, Luca. Peripheral mechanisms of dental pain: the role of substance P. **Mediators of inflammation**, v. 2012, 2012.

SAEKI, Kuniko et al. Strontium effects on root dentin tubule occlusion and nanomechanical properties. **Dental Materials**, v. 32, n. 2, p. 240-251, 2016.

SAITO, K. et al. Osteopontin is essential for type I collagen secretion in reparative dentin. **Journal of dental research**, v. 95, n. 9, p. 1034-1041, 2016.

SANGWAN, P. et al. Tertiary dentinogenesis with calcium hydroxide: a review of proposed mechanisms. **International endodontic journal**, v. 46, n. 1, p. 3-19, 2013.

SCHAIBLE, Hans-Georg; RICHTER, Frank. Pathophysiology of pain. **Langenbeck's archives of surgery**, v. 389, n. 4, p. 237-243, 2004.

SEMEGHINI, Mayara Sgarbi et al. In vitro evaluation of the odontogenic potential of mouse undifferentiated pulp cells. **Brazilian dental journal**, v. 23, n. 4, p. 328-336, 2012.

SESSLE, Barry J. Acute and chronic craniofacial pain: brainstem mechanisms of nociceptive transmission and neuroplasticity, and their clinical correlates. **Critical Reviews in Oral Biology & Medicine**, v. 11, n. 1, p. 57-91, 2000.

SESSLE, Barry J. Peripheral and central mechanisms of orofacial inflammatory pain. In: **International review of neurobiology**. Academic Press, 2011. p. 179-206.

SEYBOLD, V. S. The role of peptides in central sensitization. In: **Sensory Nerves**. Springer, Berlin, Heidelberg, 2009. p. 451-491

SHERWOOD, Thomas W.; FREY, Erin N.; ASKWITH, Candice C. Structure and activity of the acid-sensing ion channels. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 303, n. 7, p. C699-C710, 2012.

SHINDER, V.; DEVOR, M. Structural basis of neuron-to-neuron cross-excitation in dorsal root ganglia. **Journal of neurocytology**, v. 23, n. 9, p. 515-531, 1994.

SHINODA, Masamichi et al. P2X3 receptor mediates heat hyperalgesia in a rat model of trigeminal neuropathic pain. **The Journal of Pain**, v. 8, n. 7, p. 588-597, 2007.

SILVA, Markelane Santana et al. Prevalence and predictive factors of dentin hypersensitivity in Brazilian adolescents. **Journal of clinical periodontology**, v. 46, n. 4, p. 448-456, 2019.

SIMON, S. et al. Molecular characterization of young and mature odontoblasts. **Bone**, v. 45, n. 4, p. 693-703, 2009.

SINGH, RAJESH P. et al. Definition of a specific interaction between the early T lymphocyte activation 1 (Eta-1) protein and murine macrophages in vitro and its effect upon macrophages in vivo. **Journal of Experimental Medicine**, v. 171, n. 6, p. 1931-1942, 1990.

SIQUEIRA, S. R. D. T. et al. Abnormal expression of voltage-gated sodium channels Nav1. 7, Nav1. 3 and Nav1. 8 in trigeminal neuralgia. **Neuroscience**, v. 164, n. 2, p. 573-577, 2009.

SLOAN, A. J.; SMITH, A. J. Stimulation of the dentine–pulp complex of rat incisor teeth by transforming growth factor- β isoforms 1–3 in vitro. **Archives of oral biology**, v. 44, n. 2, p. 149-156, 1999.

SLOAN, Alastair J. Biology of the dentin-pulp complex. In: **Stem cell biology and tissue engineering in dental sciences**. Academic Press, 2015. p. 371-378.

Sodek J, Ganss B, Mckee MD. Osteopontin. **Crit Rev Oral Biol Med** 2000; 11:279–303

SODEYAMA, T. et al. Responses of periodontal nerve terminals to experimentally induced occlusal trauma in rat molars: an immunohistochemical study using PGP 9.5 antibody. **Journal of periodontal research**, v. 31, n. 4, p. 235-248, 1996.

SOLÉ-MAGDALENA, Antonio et al. Molecular basis of dental sensitivity: The odontoblasts are multisensory cells and express multifunctional ion channels. **Annals of Anatomy-Anatomischer Anzeiger**, v. 215, p. 20-29, 2018.

SREENATH, Taduru et al. Dentin sialophosphoprotein knockout mouse teeth display widened predentin zone and develop defective dentin mineralization similar to human dentinogenesis imperfecta type III. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 27, p. 24874-24880, 2003.

STEEDS, Charlotte E. The anatomy and physiology of pain. **Surgery (Oxford)**, v. 27, n. 12, p. 507-511, 2009.

SUADICANI, Sylvia O. et al. Bidirectional calcium signaling between satellite glial cells and neurons in cultured mouse trigeminal ganglia. **Neuron glia biology**, v. 6, n. 1, p. 43-51, 2010.

SUTHERLAND, John C. Biological Effects of Polychromatic Light¶. **Photochemistry and photobiology**, v. 76, n. 2, p. 164-170, 2002.

TAKAMORI, Yasuhiko et al. Capacity of dental pulp differentiation in mouse molars as demonstrated by allogenic tooth transplantation. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 56, n. 12, p. 1075-1086, 2008.

TAKEDA, Mamoru et al. Activation of NK1 receptor of trigeminal root ganglion via substance P paracrine mechanism contributes to the mechanical allodynia in the temporomandibular joint inflammation in rats. **Pain**, v. 116, n. 3, p. 375-385, 2005 (B).

TAKEDA, Mamoru et al. Temporomandibular joint inflammation potentiates the excitability of trigeminal root ganglion neurons innervating the facial skin in rats. **Journal of neurophysiology**, v. 93, n. 5, p. 2723-2738, 2005 (A).

TAKEDA, Mamoru; TAKAHASHI, Masayuki; MATSUMOTO, Shigeji. Contribution of the activation of satellite glia in sensory ganglia to pathological pain. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 33, n. 6, p. 784-792, 2009.

TANAKA, Brian S. et al. A gain-of-function mutation in Nav1. 6 in a case of trigeminal neuralgia. **Molecular Medicine**, v. 22, n. 1, p. 338-348, 2016.

TAY, Lidia Yileng et al. Assessing the effect of a desensitizing agent used before in-office tooth bleaching. **The Journal of the American Dental Association**, v. 140, n. 10, p. 1245- 1251, 2009.

TÉCLÈS, Odile et al. Human tooth culture: a study model for reparative dentinogenesis and direct pulp capping materials biocompatibility. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials**, v. 85, n. 1, p. 180-187, 2008.

TSUZUKI, Kenzo et al. Increase of preprotachykinin mRNA in the uninjured mandibular neurons after rat infraorbital nerve transection. **Neuroscience letters**, v. 345, n. 1, p. 57-60, 2003.

TZIAFAS, D. The future role of a molecular approach to pulp-dentinal regeneration. **Caries research**, v. 38, n. 3, p. 314-320, 2004.

UAESOONTRACHOON, Kitipong et al. Osteopontin deficiency delays inflammatory infiltration and the onset of muscle regeneration in a mouse model of muscle injury. **Disease models & mechanisms**, v. 6, n. 1, p. 197-205, 2013.

VANDEWAUW, Ine; OWSIANIK, Grzegorz; VOETS, Thomas. Systematic and quantitative mRNA expression analysis of TRP channel genes at the single trigeminal and dorsal root ganglion level in mouse. **BMC neuroscience**, v. 14, n. 1, p. 21, 2013.

VIEIRA, Alessandra Helen Magacho et al. Clinical evaluation of a 3% potassium oxalate gel and a GaAlAs laser for the treatment of dentinal hypersensitivity. **Photomedicine and laser surgery**, v. 27, n. 5, p. 807-812, 2009.

VILLA, Giovanni et al. Expression and contribution of satellite glial cells purinoceptors to pain transmission in sensory ganglia: an update. **Neuron glia biology**, v. 6, n. 1, p. 31-42, 2010.

VIT, Jean-Philippe et al. Satellite glial cells in the trigeminal ganglion as a determinant of orofacial neuropathic pain. **Neuron glia biology**, v. 2, n. 4, p. 247, 2006.

VOLLENWEIDER, Meret et al. Remineralization of human dentin using ultrafine bioactive glass particles. **Acta Biomaterialia**, v. 3, n. 6, p. 936-943, 2007.

WAKABAYASHI, Hajime et al. Effect of irradiation by semiconductor laser on responses evoked in trigeminal caudal neurons by tooth pulp stimulation. **Lasers in surgery and medicine**, v. 13, n. 6, p. 605-610, 1993.

WAKISAKA, S. et al. The distribution and origin of calcitonin gene-related peptide-containing nerve fibres in feline dental pulp. **Histochemistry**, v. 86, n. 6, p. 585-589, 1987.

WALDMANN, Rainer et al. A proton-gated cation channel involved in acid-sensing. **Nature**, v. 386, n. 6621, p. 173, 1997.

WEBER, Georg F.; CANTOR, Harvey. The immunology of Eta-1/osteopontin. **Cytokine & growth factor reviews**, v. 7, n. 3, p. 241-248, 1996.

WEMMIE, John A.; PRICE, Margaret P.; WELSH, Michael J. Acid-sensing ion channels: advances, questions and therapeutic opportunities. **Trends in neurosciences**, v. 29, n. 10, p. 578-586, 2006.

WEST, N. X. Dentine hypersensitivity. In: **Dental Erosion**. Karger Publishers, 2006. p. 173- 189.

WEST, Nicola Xania et al. Prevalence of dentine hypersensitivity and study of associated factors: a European population-based cross-sectional study. **Journal of dentistry**, v. 41, n. 10, p. 841-851, 2013.

WILLIAMS, Amanda C. de C.; CRAIG, Kenneth D. Updating the definition of pain. **Pain**, v. 157, n. 11, p. 2420-2423, 2016.

WU, Shengnan et al. Cancer phototherapy via selective photoinactivation of respiratory chain oxidase to trigger a fatal superoxide anion burst. **Antioxidants & redox signaling**, v. 20, n. 5, p. 733-746, 2014.

XIE, Xiaohua et al. Expression of Small Integrin-Binding Ligand N-linked Glycoproteins (SIBLING s) in the reparative dentin of rat molars. **Dental Traumatology**, v. 30, n. 4, p. 285- 295, 2014.

XU, Wenhua et al. Changes in the expression of voltage-gated sodium channels Nav1. 3, Nav1. 7, Nav1. 8, and Nav1. 9 in rat trigeminal ganglia following chronic constriction injury. **Neuroreport**, v. 27, n. 12, p. 929-934, 2016.

YAGHINI, Jaber et al. Evaluation of the effect of low level laser therapy toothbrush in treatment of dentin hypersensitivity. **Journal of lasers in medical sciences**, v. 6, n. 2, p. 85, 2015.

YAMAGUCHI, M. et al. Neuropeptides stimulate production of interleukin-1 β , interleukin-6, and tumor necrosis factor- α in human dental pulp cells. **Inflammation research**, v. 53, n. 5, p. 199-204, 2004.

YE, Ling et al. Deletion of dentin matrix protein-1 leads to a partial failure of maturation of predentin into dentin, hypomineralization, and expanded cavities of pulp and root canal during postnatal tooth development. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 18, p. 19141-19148, 2004.

YOSHIZAKI, K. T. et al. Clinical features and factors associated with non-carious cervical lesions and dentin hypersensitivity. **Journal of oral rehabilitation**, v. 44, n. 2, p. 112-118, 2017.

ZEOLA, Livia Favaro; SOARES, Paulo Vinícius; CUNHA-CRUZ, Joana. Prevalence of dentin hypersensitivity: Systematic review and meta-analysis. **Journal of dentistry**, 2019.

ZHA, Xiang-ming. Acid-sensing ion channels: trafficking and synaptic function. **Molecular brain**, v. 6, n. 1, p. 1, 2013.

ZHANG, Haijun et al. Altered functional properties of satellite glial cells in compressed spinal ganglia. **Glia**, v. 57, n. 15, p. 1588-1599, 2009.

ZHANG, X. et al. Neuronal somatic ATP release triggers neuron–satellite glial cell communication in dorsal root ganglia. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 23, p. 9864-9869, 2007.

ZHU, Qinglin et al. Proteolytic processing of dentin sialophosphoprotein (DSPP) is essential to dentinogenesis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 36, p. 30426-30435, 2012.

ZIMMERMANN, Manfred. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. **Pain**, v. 16, n. 2, p. 109-110, 1983.

*De acordo com a ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 14724: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2011