



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José dos Campos
Instituto de Ciência e Tecnologia

ALETÉIA MASSULA DE MELO FERNANDES

**CITOTOXICIDADE, PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS
DE OXIGÊNIO, EXPRESSÃO DE MARCADORES
CELULARES E PRODUÇÃO DE $\text{TNF}\alpha$ EM MACRÓFAGOS
APÓS EXPOSIÇÃO A AGENTES CLAREADORES**

ALETÉIA MASSULA DE MELO FERNANDES

**CITOTOXICIDADE, PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE
OXIGÊNIO, EXPRESSÃO DE MARCADORES CELULARES E
PRODUÇÃO DE TNF α EM MACRÓFAGOS APÓS EXPOSIÇÃO A
AGENTES CLAREADORES**

Tese apresentada ao curso de Odontologia do Instituto de Ciência e Tecnologia, UNESP – Univ Estadual Paulista, Campus de São José dos Campos, como parte dos requisitos para obtenção do título de DOUTOR, pelo Programa de Pós-Graduação em ODONTOLOGIA RESTAURADORA, Área de Endodontia.

Orientador: Profa. Tit. Márcia Carneiro Valera

Co-orientador: Profa. Dra. Samira Esteves Afonso Camargo

São José dos Campos

2013

Apresentação gráfica e normalização de acordo com:
Alvarez S, Coelho DCAG, Couto RAO, Durante APM. Guia prático para
Normalização de Trabalhos Acadêmicos do ICT. Rev. São José dos Campos:
ICT/UNESP; 2013.

F391c Fernandes, Aletéia Massula de Melo

Citotoxicidade, produção de espécies reativas de oxigênio, expressão de marcadores celulares e produção de TNF α em macrófagos após exposição a agentes clareadores / Aletéia Massula de Melo Fernandes. - São José dos Campos: [s.n.], 2013.

122 f.: il.

Tese (Doutorado em Odontologia Restauradora) – Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos, UNESP - Univ Estadual Paulista, 2013.

Orientador: Profa. Marcia Carneiro Valera

Co-Orientador: Samira Esteves Afonso Camargo

1. Agentes clareadores. 2. Citotoxicidade 3. ROS. I. Valera, Marcia Carneiro. II. Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos, UNESP – Univ. Estadual Paulista. III. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. IV. UNESP – Univ. Estadual Paulista. V. Título

tD22

Ficha catalográfica elaborada pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação do
Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos – UNESP

AUTORIZAÇÃO

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

São José dos Campos, 07 de Novembro de 2013.

E-mail: aleteia.fernandes@hotmail.com

Assinatura: _____

BANCA EXAMINADORA

Profa. Titular Márcia Carneiro Valera (Orientador)

Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos
UNESP – Univ Estadual Paulista

Profa. Adjunto Ana Paula Martins Gomes

Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos
UNESP – Univ Estadual Paulista

Prof. Dr. Bruno das Neves Cavalcanti

Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos
UNESP – Univ Estadual Paulista

Prof. Adjunto. Renato de Toledo Leonardo

Faculdade de Odontologia de Araraquara
UNESP – Univ Estadual Paulista

Prof. Dr. Renato Miotto Palo

São José dos Campos, 02 de agosto de 2013.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao meu querido avô Vanderlan, minha inspiração na
Odontologia.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por me dar força e iluminar o meu caminho.
Obrigada por estar sempre comigo.

Aos meus pais:

Pai, Mãe e Denis,

Agradecer tudo o que vocês fizeram por mim é pouco. Obrigada por me proporcionarem uma boa educação e a chance de poder entrar em um curso de pós-graduação. Sem o apoio e incentivo de vocês esse sonho não seria possível. Amo vocês.

Aos meus irmãos:

Daniel e Pedro, vocês são os amores da minha vida, minha perspectiva de futuro, minha fonte de inspiração. Obrigada por existirem.

Ao meu avô Vanderlan:

Obrigada por acreditar e ter tanto orgulho de mim. Sei que você se sente realizado por me ver no mundo acadêmico. Não esqueça que você foi parte fundamental para que isso acontecesse. Obrigada, te amo.

Ao meu namorado Ricardo:

Obrigada por ser meu namorado e meu melhor amigo. Te amo!

Aos meus queridos amigos: Juliana, Isabel, Izabel, Laura, Gustavo M, Daniela, Gustavo S, David, Murilo, Luciana, Marcinha, Cintia, Melini, Graziella, Fernanda Costa, Fernanda Oliveira, Wivian e Camila. Obrigada por fazerem parte da minha vida. Sem vocês tudo seria mais difícil. Amo vocês.

Ciça, Dani e Gigi, obrigada por estarem ao meu lado todos os dias. Amo vocês como irmãs, para sempre.

Flavinha, obrigada por todo apoio e amizade dentro e fora da Faculdade. Em pouco tempo você se tornou uma grande amiga. Você está traçando um futuro brilhante, tenho certeza que será muito feliz! Te amo!

Gle, obrigada por fazer parte da minha vida. Espero que você aproveite cada segundo dessa sua nova jornada! Te amo!

À amiga Polyana, minha companheira na Alemanha para todas as horas. Poly, esse trabalho também é seu. Obrigada por fazer parte da minha vida, te desejo tudo de melhor nessa vida! Te amo!

À minha tia Alcione e aos meus primos Leonardo e Letícia por estarem sempre presentes torcendo por mim. Amo vocês.

À família Dorna, especialmente à Marcia, obrigada por todo apoio, carinho e mimo! Vocês são minha segunda família. Amo vocês!

À toda minha família:

Obrigada pelo apoio e incentivo sempre. Amo vocês!

À minha orientadora:

Professora Márcia, obrigada pela oportunidade de trabalhar com a senhora. A pós-graduação despertou em mim uma paixão pelo mundo da pesquisa e pela carreira acadêmica e isso não teria acontecido se eu não tivesse alguém em quem me espelhar; sem dúvida nenhuma essa pessoa foi você. Espero ter uma carreira tão brilhante quanto a sua. Obrigada por ter sido minha orientadora e amiga. Te respeito e te admiro muito.

Ique e Samira,

Obrigada pelo carinho, dedicação. Tenho muita sorte de poder contar com pessoas tão competentes, prestativas, especiais e amigas. Vocês foram parte fundamental para a realização desse trabalho. Obrigada por tudo.

À professora Ana Paula,

Mesmo não sendo minha orientadora a senhora me ensinou muito sobre endodontia e sobre a vida. Afinidade não se explica, simplesmente acontece, com a senhora foi assim. Obrigada pelo carinho, atenção e amizade.

Ao professor Lafayette,

Obrigada pro todo apoio e carinho. Você é um exemplo de profissional e um amigo muito querido.

Aos professores Bruno e Marcinha,

Obrigada por todo apoio que vocês sempre me deram. Admiro e tenho muito carinho por vocês!

À professora Suely Naressi,

Agradeço por tudo que a senhora me ensinou e por sempre ter sido uma amiga querida. Espero que a senhora continue fazendo parte da minha vida, pois é muito especial para mim.

Ao Renatinho,

Obrigada por ser um professor e amigo tão querido! Te adoro!

Aos meus amigos do Doutorado:

Marcela, Lilian, Alessandra, Paula, Ivany, Tereza, Nádia, Ana Cláudia, Rafaela e Claudia: Compartilhamos momentos de alegria, angústia e muitas vezes de desespero; mas enfim, deu tudo certo. Tenho certeza que vocês terão um futuro brilhante. Obrigada por serem meus amigos e por toda a ajuda sempre. Vocês moram no meu coração.

Aos professores Claudio e Frederico, obrigada por me ensinarem Endodontia e por estarem sempre dispostos a me ajudar.

Aos professores e funcionários do Departamento de Odontologia Restauradora da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, obrigada pelo apoio e carinho.

Aos funcionários da pós-graduação da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, obrigada por tudo.

À CAPES, pelo apoio à pesquisa e concessão de bolsa de estudo.

Agradeço à Universität Regensburg, por ter me acolhido na Alemanha. Especialmente aos Professores Schmalz e Helmut por todo o apoio, tempo e dedicação. Aos colegas de laboratório: Carola, Claudia, Christine, Olly, Stephanie, Anton, Esterra e Polyana, trabalhar com vocês foi uma experiência fantástica. Obrigada por tudo que vocês me ensinaram, vocês moram eternamente no meu coração.

À cidade de Regensburg, por me proporcionar um ano maravilhoso, cheio de descobertas e conquistas; a realização de um sonho. Sinto saudades todos os dias.

Aos amigos feitos na Alemanha, Larissa, Camila, Marcio, Dani, Luiz, Arthur, Fernando, Skiter, Tálita, Naira e Marisa. Vocês foram um presente de Deus na minha vida. Nunca esquecerei tudo que vivemos juntos! Saudades!

Quio, Você foi um grande presente que a Alemanha me deu. Obrigada por estar presente em todos os momentos. Saudades!

Obrigada a todos que de alguma forma colaboraram na realização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	11
LISTA DE QUADROS E TABELAS.....	17
RESUMO.....	19
ABSTRACT.....	20
1 INTRODUÇÃO.....	21
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	25
2.1 Clareamento dental.....	25
2.2 Toxicidade de agentes clareadores.....	30
2.3 Espécies Reativas de Oxigênio (ROS).....	37
2.4 Efeitos dos agentes clareadores na resposta inflamatória e imunológica.....	40
3 PROPOSIÇÃO.....	43
4 MATERIAL E MÉTODO.....	44
4.1 Cultivo das células.....	44
4.1.1 Descongelamento.....	45
4.1.2 Troca de meio.....	46
4.1.3 Subcultura.....	46
4.1.4 Contagem de células.....	47
4.2 Preparo dos extratos originais.....	48
4.3 Preparo dos aditivos.....	49
4.4 Avaliação da viabilidade celular pelo Método do MTT.....	50
4.5 Avaliação da sobrevivência celular pelo teste Cristal Violeta	52
4.6 Produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS).....	53
4.7 Detecção de Marcadores de superfície: CD14, CD40 e CD 54	56
4.8 Avaliação da produção de TNFα por ELISA.....	57
4.9 Análise estatística.....	58

5 RESULTADOS.....	59
5.1 Avaliação da viabilidade celular.....	59
5.2 Avaliação da sobrevivência celular.....	64
5.3 Mensuração dos níveis de espécies reativas de oxigênio.....	70
5.4 Análise da detecção de marcadores de superfície: CD14, CD40 e CD54.....	75
5.5 Avaliação da produção de TNFα por ELISA.....	82
6 DISCUSSÃO.....	85
6.1 Discussão da Metodologia.....	85
6.2 Discussão dos Resultados.....	90
7 CONCLUSÃO.....	96
8 REFERÊNCIAS.....	97
ANEXOS.....	111

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Células RAW 264.7.....	45
Figura 2 -	A e B) Colocação de 10 µl da suspensão celular na câmar de Neubauer; C) Câmara de Neubauer pronta para ser levada ao microscópio.....	48
Figura 3 -	Agentes Clareadores: Opalescence Boost 40% e Opalescence PF 20%.....	49
Figura 4 -	Citômetro de Fluxo.....	55
Figura 5 -	Gráfico de barras ilustrando o efeito do H ₂ O ₂ 10% na viabilidade celular em diferentes períodos de avaliação.....	59
Figura 6 -	Gráfico de barras ilustrando o efeito do Peróxido de Carbamida 20% na viabilidade celular em diferentes períodos de avaliação.....	60
Figura 7 -	Gráfico de barras ilustrando o efeito do Peróxido de Hidrogênio 40% na viabilidade celular em diferentes períodos de avaliação.....	60
Figura 8 -	Gráfico de barras ilustrando o efeito do H ₂ O ₂ 10% na sobrevivência celular em diferentes períodos de avaliação.....	65

Figura 9 -	Gráfico de barras ilustrando o efeito do Peróxido de Carbamida 20% na sobrevivência celular em diferentes períodos de avaliação.....	66
Figura 10 -	Gráfico de barras ilustrando o efeito do Peróxido de Hidrogênio 40% na sobrevivência celular em diferentes períodos de avaliação.....	67
Figura 11 -	Gráfico de barras ilustrando o efeito do H ₂ O ₂ 10% na produção de ROS em diferentes períodos de avaliação.....	71
Figura 12 -	Gráfico de barras ilustrando o efeito do Peróxido de Carbamida 20% na produção de ROS em diferentes períodos de avaliação.....	72
Figura 13 -	Gráfico de barras ilustrando o efeito do Peróxido de Hidrogênio 40% na produção de ROS em diferentes períodos de avaliação.....	73
Figura 14 -	Gráfico de barras ilustrando o efeito do TEGDMA na produção de ROS em diferentes períodos de avaliação.....	74
Figura 15 -	Gráfico de barras ilustrando a expressão de CD14 frente aos agentes clareadores (H ₂ O ₂ 10%, Peróxido de Carbamida 20% e Peróxido de Hidrogênio 40%) com e sem estimulação por LPS..	79

Figura 16 -	Gráfico de barras ilustrando a expressão de CD40 frente aos agentes clareadores (H_2O_2 10%, Peróxido de Carbamida 20% e Peróxido de Hidrogênio 40%) com e sem estimulação por LPS..	80
Figura 17 -	Gráfico de barras ilustrando a expressão de CD54 frente aos agentes clareadores (H_2O_2 10%, Peróxido de Carbamida 20% e Peróxido de Hidrogênio 40%) com e sem estimulação por LPS..	81
Figura 18 -	Gráfico de barras ilustrando a produção de TNF- α após exposição aos agentes clareadores (H_2O_2 10%, Peróxido de Carbamida 20% e Peróxido de Hidrogênio 40%) com e sem estimulação por LPS..	84
Figura 19 -	Gráfico de linhas ilustrando o efeito do H_2O_2 10% na viabilidade celular no período de 1 hora.....	111
Figura 20 -	Gráfico de linhas ilustrando o efeito do H_2O_2 10% na viabilidade celular no período de 1 hora + 23 horas.....	111
Figura 21 -	Gráfico de linhas ilustrando o efeito do H_2O_2 10% na viabilidade celular no período de 24 horas.....	112
Figura 22 -	Gráfico de linhas ilustrando o efeito do Peróxido de Carbamida 20% na viabilidade celular no período de 1 hora.....	112

Figura 23 -	Gráfico de linhas ilustrando o efeito do Peróxido de Carbamida 20% na viabilidade celular no período de 1 hora + 23 horas.....	113
Figura 24 -	Gráfico de linhas ilustrando o efeito do Peróxido de Carbamida 20% na viabilidade celular no período de 24 horas.....	113
Figura 25 -	Gráfico de linhas ilustrando o efeito do Peróxido de Hidrogênio 40% na viabilidade celular no período de 1 hora.....	114
Figura 26 -	Gráfico de linhas ilustrando o efeito do Peróxido de Hidrogênio 40% na viabilidade celular no período de 1 hora + 23 horas.....	114
Figura 27 -	Gráfico de linhas ilustrando o efeito do Peróxido de Hidrogênio 40% na viabilidade celular no período de 24 horas.....	115
Figura 28 -	Gráfico de linhas ilustrando o efeito do H ₂ O ₂ 10% na sobrevivência celular no período de 1 hora.....	116
Figura 29 -	Gráfico de linhas ilustrando o efeito do H ₂ O ₂ 10% na sobrevivência celular no período de 1 hora + 23 horas.....	116
Figura 30 -	Gráfico de linhas ilustrando o efeito do H ₂ O ₂ 10% na sobrevivência celular no período de 24 horas....	117

Figura 31 -	Gráfico de linhas ilustrando o efeito do Peróxido de Carbamida 20% na sobrevivência celular no período de 1 hora.....	117
Figura 32 -	Gráfico de linhas ilustrando o efeito do Peróxido de Carbamida 20% na sobrevivência celular no período de 1 hora + 23 horas.....	118
Figura 33 -	Gráfico de linhas ilustrando o efeito do Peróxido de Carbamida 20% na sobrevivência celular no período de 24 horas.....	118
Figura 34 -	Gráfico de linhas ilustrando o efeito do Peróxido de Hidrogênio 40% na sobrevivência celular no período de 1 hora.....	119
Figura 35 -	Gráfico de linhas ilustrando o efeito do Peróxido de Hidrogênio 40% na sobrevivência celular no período de 1 hora + 23 horas.....	119
Figura 36 -	Gráfico de linhas ilustrando o efeito do Peróxido de Hidrogênio 40% na sobrevivência celular no período de 24 horas.....	120
Figura 37 -	Gráfico de barras ilustrando o efeito do H ₂ O ₂ 10% na produção de TNF α	121
Figura 38 -	Gráfico de barras ilustrando o efeito do Peróxido de Carbamida 20% na produção de TNF α	121

Figura 39 - Gráfico de barras ilustrando o efeito do Peróxido de Hidrogênio 40% na produção de TNF α 122

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1 - Divisão dos grupos experimentais para os testes: MTT e KVT.....	52
Quadro 2 - Divisão dos grupos experimentais para o teste de ROS..	54
Quadro 3 - Divisão dos grupos experimentais para o teste de Marcadores de Superfície e ELISA.....	56
Tabela 1 - Teste de Mann Whitney comarando o Grupo Controle com H ₂ O ₂ 10% nos três períodos de avaliação no ensaio MTT.....	62
Tabela 2 - Teste de Mann Whitney comarando o Grupo Controle com Peróxido de Carbamida 20% nos três períodos de avaliação no ensaio MTT.....	63
Tabela 3 - Teste de Mann Whitney comarando o Grupo Controle com Peróxido de Hidrogênio 40% nos três períodos de avaliação no ensaio MTT.....	64
Tabela 4 - Teste de Mann Whitney comarando o Grupo Controle com H ₂ O ₂ 10% nos três períodos de avaliação no ensaio KVT.....	68

Tabela 5 -	Teste de Mann Whitney comarando o Grupo Controle com Peróxido de Carbamida 20% nos três períodos de avaliação no ensaio KVT.....	69
------------	--	----

Tabela 6 -	Teste de Mann Whitney comarando o Grupo Controle com Peróxido de Hidrogênio 40% nos três períodos de avaliação no ensaio KVT.....	70
------------	---	----

Fernandes AMM. Citotoxicidade, produção de espécies reativas de oxigênio, expressão de marcadores celulares e produção de TNF α em macrófagos, após exposição a agentes clareadores [tese]. São José dos Campos (SP): Instituto de Ciência e Tecnologia, UNESP - Univ Estadual Paulista; 2013.

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar a citotoxicidade, produção de espécies reativas de oxigênio, análise de marcadores celulares e presença de TNF α em macrófagos após exposição a agentes clareadores. Foram utilizadas culturas celulares de macrófagos RAW 264.7 expostas a dois géis clareadores: Peróxido de hidrogênio 40% e Peróxido de Carbamida 20% e ao Peróxido de Hidrogênio puro (10%) que atuou como controle positivo, em diversos períodos de avaliação. Esses clareadores foram utilizados sozinhos e aditivados à NAC e ao BSO. A viabilidade celular foi determinada pelo ensaio MTT, assim como a sobrevivência celular foi avaliada pelo ensaio cristal violeta. A liberação de espécies reativas de oxigênio foi mensurada utilizando uma sonda fluorescente sensível a oxidação-H2DCF-D. Para a verificação da presença dos marcadores celulares CD14, CD40 e CD54, envolvidos no processo inflamatório e na resposta imune, foi utilizada a citometria de fluxo, enquanto que a produção de TNF α foi quantificada por ELISA. A análise estatística foi realizada através do teste Mann–Whitney com nível de significância a 5%. Os resultados obtidos permitiram concluir que: todos os peróxidos diminuíram a viabilidade e a sobrevivência celular, sendo a toxicidade desses clareadores proporcional às suas concentrações; todos os peróxidos estimularam a produção de ROS, sendo que a NAC apresentou tendência a diminuir essa produção, enquanto que o BSO apresentou efeito oposto; a expressão dos marcadores celulares foram aumentadas pelo uso do LPS, sendo o marcador mais expresso o CD54, seguido pelo CD40 e CD14; a estimulação por LPS aumentou a produção de TNF α e os peróxidos tiveram a tendência a aumentar essa produção.

Palavras-chave: Agentes clareadores. Citotoxicidade. ROS.

Fernandes AMM. Cytotoxicity, production of reactive oxygen species, analysis of surface markers and production of TNF α in macrophages exposed to bleaching agents [doctorate thesis]. São José dos Campos (SP): Institute of Science and Technology, UNESP - Univ Estadual Paulista; 2013.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the cytotoxicity, production of reactive oxygen species, analysis of cellular markers and the presence of TNF α in macrophages after exposure to bleaching agents. Cultures of RAW 264.7 macrophages were exposed to two bleaching gels: 40% Hydrogen Peroxide 20% Carbamide Peroxide; 10% pure Hydrogen Peroxide served as positive control, in different periods. These bleaching agents were used alone and associated with NAC and BSO. Cell viability was determined by MTT assay, and cell survival was assessed by crystal violet assay. The release of reactive oxygen species was measured using a fluorescent probe sensitive to oxidation-H₂DCF-D. To verify the presence of the surface markers CD14, CD40, and CD54, involved in the inflammatory and immune response, it was used a flow cytometry, while the production of TNF α was measured by ELISA. Statistical analysis was performed using the Mann-Whitney test with a significance level of 5%. Results concluded that: all peroxides decreased the viability and cell survival, and toxicity of these bleaching was in proportion to their concentrations; all peroxides stimulated ROS production, and NAC showed a tendency to reduce this production while the BSO showed the opposite effect; the expression of surface markers were increased by the use of LPS, and the more expressed surface markers was the CD54, followed by CD40 and CD14; LPS stimulation increased the production of TNF α and peroxides had the tendency to increase this production, with the exception of higher concentrations, where most of the cells were dead.

Keywords: Bleaching Agents. Cytotoxicity. ROS.

1 INTRODUÇÃO

No mundo moderno, dentes brancos, bem contornados e alinhados estabelecem o padrão de beleza dominante, no qual a estética facial e o sorriso estão intimamente relacionados. Entre as várias tecnologias desenvolvidas pela ciência odontológica, o clareamento dental é o procedimento mais utilizado, uma vez que permite a correção das alterações de cor dos dentes aliado ao baixo custo operacional (Dostalova et al., 2004).

O clareamento dental foi inicialmente referido como opção estética no fim do século XIX (Sulieman et al., 2004; Dostalova et al., 2004), entretanto veio se difundir na década de 1980, a partir do surgimento do clareamento caseiro, para no século XXI se tornar um dos procedimentos estéticos mais populares da Odontologia (Papathanasiou et al., 2002).

Goldstein et al. (1989) ressaltaram que há mais de um século o clareamento vêm sendo utilizado, apresentando grande eficácia no tratamento de manchamentos dentinários. Para Ahmad (2010), este procedimento é um dos tratamentos de escolha para reabilitação dental estética, em conjunto com o tratamento ortodôntico, restaurações diretas e indiretas.

Na realização do clareamento externo, o agente clareador mais utilizado é o peróxido de hidrogênio (Coldebella et al., 2009, Lima et al., 2013), podendo ser utilizado diretamente ou a partir de reações químicas derivadas do perborato de sódio ou do peróxido de carbamida (Dahl, Pallesen, 2003; Ribeiro et al., 2006; Coldebella et al., 2009).

Hirata et al. (1997) e Dahl e Pallesen (2003), explicam que este clareador atua como um forte agente oxidante por intermédio da

formação de radicais, os quais são altamente reativos e instáveis, o que promove a oxidação das manchas. As macromoléculas das manchas dentárias após a oxidação, se quebram em estruturas menores e se difundem em direção à superfície, e assim proporciona o clareamento dental.

O clareamento dental é possível devido à permeabilidade das estruturas dentárias aos agentes clareadores, bem como ao baixo peso molecular de alguns componentes químicos ativos, a exemplo do peróxido de hidrogênio (Arwill et al., 1969; Pashley et al., 1987; Hanks et al., 1993; Gokay et al., 2004; Coldebella et al., 2009). Estes dois fatores isoladamente, ou em conjunto, parecem facilitar a livre difusão dos agentes clareadores pelos tecidos dentais (Hanks et al., 1993; Li, 1996). Apesar de serem os tecidos mais duros do corpo humano, esmalte dentina são permeáveis ao peróxido de hidrogênio, que é capaz de atravessá-los e atingir o tecido pulpar (Benetti et al., 2004; Camargo et al., 2007).

Desta forma, alguns estudos comprovaram a difusão do peróxido de hidrogênio proveniente de agentes clareadores pelos tecidos dentais e determinaram a quantidade deste composto químico capaz de ultrapassar o esmalte e dentina para alcançar a polpa durante os procedimentos de clareamento dental (Bowles, Ugweneri, 1987; Cooper et al., 1992; Hanks et al., 1993; Thitinthapan et al., 1999; Gökay et al., 2000; Coldebella et al., 2009; Lima et al., 2013).

Os agentes clareadores (peróxido de hidrogênio e peróxido de carbamida) sofrem ionização e decomposição, produzindo radicais oxidativos, os quais são altamente instáveis e apresentam notável capacidade de reagir com outras substâncias orgânicas (Kawamoto, Tsujimoto, 2004). Em decorrência do estresse oxidativo que promovem, são conhecidos como substâncias promotoras de injúrias às células vivas.

Enquanto alguns autores consideram a utilização de agentes clareadores um procedimento seguro (Matis et al., 2000), outros acreditam que o peróxido de hidrogênio possa provocar irritação no tecido pulpar (Li, 1996), o que gera tanto sensibilidade dentária (Minoux, Serfaty, 2008; Machado et al., 2013) quanto alteração na estrutura de esmalte e dentina (Benetti et al., 2004; Zantner et al., 2007; Magalhães et al., 2012).

A importância da penetração do peróxido através das estruturas dentárias até a polpa se deve ao fato de que ao entrar em contato com os tecidos, o peróxido de hidrogênio assim como outros radicais causam destruição celular e tecidual (Simon et al., 1981; Halliwell, Gutteridge, 1984; Ramp et al., 1987; Soares et al., 2012; Dias Ribeiro et al., 2009). De acordo com Laroui et al. (2004), o peróxido de hidrogênio é capaz de interagir diretamente com o DNA e causar danos oxidativos ao mesmo. Sabe-se que danos oxidativos ao DNA vêm sendo reconhecidos como causa principal de morte celular e mutações em organismos aeróbios; em humanos é considerado um importante agente promotor de câncer (Slupphaug et al., 2003; Ribeiro et al., 2006).

Para avaliar os efeitos biológicos dos materiais dentários, o teste mais comumente utilizado é o de citotoxicidade em cultura de células, por oferecer rápido e consistente resultado em relação à atividade biológica do material testado (Freshney, 2000; Costa, 2001; Azevedo et al., 2003; Lima et al., 2009). Os testes de citotoxicidade podem ser realizados em cultura de órgãos, células ou em organelas celulares. Para os materiais odontológicos, a técnica em cultura de células é a mais indicada e utilizada; com a observação de que o contato entre as células e os materiais a serem testados, pode ocorrer de maneira direta ou indireta (Schmalz, 1994).

Alguns estudos relatam a associação do processo inflamatório com o estresse oxidativo (Riedl, Nel, 2008; Pazmandi et al., 2012). A resposta inflamatória constitui o mecanismo principal de defesa do corpo frente a uma agressão, tem a função de proteger o organismo

(Deng et al., 2009), e se desencadeia por fatores infecciosos e não-infecciosos. Os macrófagos constituem papel de fundamental importância nesse processo, uma vez que induz uma reação inflamatória, inicia e mantém respostas imunes, por meio da secreção de diferentes tipos de citocinas, como o TNF α (Lee et al., 2011; Heo et al., 2012). Além disso, possuem receptores de superfície celular como CD14, que é capaz de interagir com o LPS (Lynn, Golenbock, 1992; Zanoni et al., 2012), CD40, que apresenta papel fundamental no funcionamento do sistema imune e liberação de citocinas (Gu et al., 2012) e CD54, de notável importância ao tráfego leucocitário e ao início da resposta inflamatória (Mulvihill et al., 2002). Os macrófagos da linhagem imortalizada RAW 264.7 vêm sendo amplamente descritos na literatura como as células de escolha para realização de testes de citotoxicidade e avaliação de resposta inflamatória (Heo et al., 2012; Zhang et al., 2012; Wilhelmi et al., 2012).

Assim, estudar a liberação de radicais oxidativos após o contato das células com o peróxido de hidrogênio é de fundamental importância. Espécies reativas de oxigênio (ROS) são definidos como componentes que contém oxigênio e possuem maior reatividade que o oxigênio molecular (Baumgardner, Sulfaro 2001), a destacar o peróxido de hidrogênio como um deles. ROS são instáveis e estão prontos para reagir com outros componentes do organismo, o que pode causar danos aos componentes celulares como proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos (Nordberg, Arner, 2001; Silveira, 2004). Quantificar essas espécies reativas podem trazer resultados que permitem avaliar o potencial do peróxido de hidrogênio como causador de morte celular. Desta forma, para avaliar os efeitos biológicos dos agentes clareadores no organismo, será quantificada a expressão de marcadores celulares e a produção de TNF α , correlacionando com a produção de ROS e testes de citotoxicidade.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Clareamento dental

A estética constitui importante papel na Odontologia moderna e a beleza dos dentes é influenciada pelo contorno, forma, simetria e coloração. O clareamento dental é um dos procedimentos mais empregados na obtenção da estética do sorriso, em razão da relativa facilidade e eficácia. (Nathanson, 1997; Deliperi et al., 2004; Sulieman et al., 2005; Bruzell et al., 2009). As indicações para se utilizar este procedimento estão associadas à existência de alterações cromáticas na estrutura dentária. Estudos mostram que a técnica de clareamento é eficaz no tratamento de fluorose, manchamento por tetraciclina, pigmentação intrínseca ou extrínseca adquiridas durante o envelhecimento ou ainda em escurecimentos decorrentes da terapia endodôntica (Goldstein, Garber, 1995; Matis et al., 2000). Além disso o clareamento dental permite a preservação da estrutura dental original, dispensando intervenções restauradoras invasivas para correção das alterações de cor (Leonardo, 2005; Ozcan et al., 2013).

Existem duas técnicas para clareamento de dentes com vitalidade pulpar: de uso profissional e de clareamento caseiro supervisionada (Haywood, Heymann, 1989; Lima et al., 2013; Ozcan et al., 2013). Os agentes clareadores para uso profissional apresentam elevadas concentrações de peróxido de hidrogênio (35%, 37% ou 38%) e peróxido de carbamida (35%) (Gökay et al., 2000; Soares et al., 2012). A técnica de clareamento caseiro, introduzida por Haywood e Heymann no ano de 1989 (Haywood, Heymann, 1989) consiste na utilização de

agentes clareadores à base de peróxido de carbamida em concentrações mais baixas (10% a 20%) que os agentes de uso em consultório, ou peróxido de hidrogênio (1,5% a 9,5%). Estes agentes químicos são utilizados pelos pacientes em aplicações diárias de 1 a 8 horas com moldeira personalizada, por períodos que podem variar de 2 a 4 semanas (Haywood, 1997; Lima et al., 2013). O clareamento dental de uso caseiro supervisionado tem sido amplamente empregado, principalmente pela sua praticidade e baixo custo.

Durante o processo de clareamento, o agente ativo é o peróxido de hidrogênio, com utilização direta ou como subproduto de outras substâncias. O peróxido de carbamida, por ser uma substância instável, quando entra em contato com saliva ou tecidos se dissocia e libera o peróxido de hidrogênio como substância ativa. O peróxido de carbamida a 10% dissocia em peróxido de hidrogênio a 3,6% e uréia a 6,4%. O peróxido de hidrogênio degrada-se em oxigênio e água enquanto que a uréia em amônia e dióxido de carbono (Feinman et al., 1987; Ribeiro et al., 2006; Coldebella et al., 2009).

Os agentes clareadores dentais, peróxido de carbamida e peróxido de hidrogênio, sofrem ionização e decomposição, produzindo radicais oxidativos, os quais são altamente instáveis e apresentam notável capacidade de reagir com outras substâncias orgânicas (Kawamoto, Tsujimoto, 2004). As espécies reativas derivadas do oxigênio são conhecidas como promotoras de injúrias às células vivas devido ao estresse oxidativo que promovem. Esse estresse pode causar apoptose, danos ao DNA (genotoxicidade) e citotoxicidade (Li, 1996; Floyd, 1997; Kanno et al., 2003; Ribeiro et al., 2006).

Com o avanço e aplicabilidade do clareamento foram surgindo críticas sobre os efeitos deletérios que o mesmo poderia causar nos tecidos bucais. Esses efeitos podem ser decorrentes do baixo peso molecular dos agentes clareadores, o que permite a difusão destes pela

estrutura dentária, com possibilidade de alcançar os tecidos pulpare e periodontais (Benetti et al., 2004; Gokay et al., 2008).

Bowles e Ugweneri (1987) demonstraram que o peróxido de hidrogênio penetra nos tecidos duros dentais e atinge a câmara pulpar mesmo em baixas concentrações. Os autores determinaram, ainda, que a quantidade de peróxido de hidrogênio dentro da câmara pulpar pode aumentar com a elevação de sua concentração, sendo que para 1%, 10% e 30% os valores foram de 1,8 µg; 5,8 µg e 25,4 µg, respectivamente. Os autores demonstraram haver penetração substancial de peróxido de hidrogênio na câmara pulpar.

Cooper et al. (1992) quantificaram o peróxido de hidrogênio liberado a partir do peróxido de carbamida 10% ou 15% e o gel de peróxido de hidrogênio 5% ou 30% e concluíram que ocorre menor penetração pulpar de peróxido de hidrogênio a partir do peróxido de carbamida quando comparado ao peróxido de hidrogênio livre.

Camargo et al. (2007) avaliaram a quantidade de peróxido de hidrogênio 38% capaz de atravessar dentes humanos e bovinos hígidos e restaurados com resina composta, cimento ionômero de vidro e cimento ionômero de vidro modificado por resina. Os autores concluíram que os dentes humanos são mais permeáveis ao peróxido de hidrogênio que os bovinos e que o cimento de ionômero de vidro modificado por resina mostrou-se o material mais permeável a esse clareador.

Em 1993, utilizando-se de um dispositivo chamado câmara pulpar in vitro, Hanks et al. avaliaram a permeabilidade de discos de dentina de 0,5 mm ao peróxido de carbamida a 10 e 15% e ao peróxido de hidrogênio a 2 e 10%, aplicando o agente clareador sobre a dentina por uma ou seis horas. Os autores concluíram que a quantidade de peróxido de hidrogênio que atravessa a dentina é proporcional à concentração original do agente clareador e ao tempo de aplicação.

Ao utilizar a mesma metodologia, Soares et al. (2012) avaliaram o quanto de peróxido de hidrogênio 35% que foi capaz de

atravessar discos de esmalte e dentina e chegar à câmara pulpar artificial. O tempo de contato do agente clareador com os discos variou da seguinte maneira: três aplicações de 15 minutos, uma aplicação de 15 minutos, três aplicações de 5 minutos e uma aplicação de 5 minutos. Os resultados mostraram que a quantidade de peróxido de hidrogênio presente na câmara pupar foi proporcional ao tempo de aplicação do gel.

Os estudos realizados por Gökay et al. (2000) e Benetti et al. (2004), também concluíram que quanto mais elevada a concentração do agente clareador aplicado sobre a estrutura dentária, maior a penetração do peróxido de hidrogênio dentro da câmara pulpar, especialmente se estes dentes apresentarem restaurações.

Nos últimos anos, foi introduzida uma técnica de clareamento que usa tiras flexíveis aplicadas diretamente sobre os dentes. Estas tiras contêm várias concentrações de peróxido de hidrogênio (5,3%, 6,5% e 14%) e eliminam a necessidade da utilização de moldeiras. Gökay et al. (2004) avaliaram *in vitro* a possível penetração de dois agentes clareadores (peróxido de hidrogênio 6,5% e 14%), contidos nestas tiras, para o interior da câmara pulpar. Os resultados indicaram que o peróxido de hidrogênio presente nestas tiras de clareamento realmente penetra na câmara pulpar e é proporcional a concentrações mais altas desse agente. Uma tira clareadora e três clareadores líquidos (*paint-on*), encontrados para venda direta ao consumidor, foram avaliados por Gökay et al. (2005) que verificou que o peróxido de hidrogênio oriundo dos quatro produtos testados chegou ao interior da câmara pulpar, sendo a maior quantidade encontrada de peróxido no grupo em que foi aplicada a tira clareadora.

De acordo com Auschill et al. (2005) a comparação entre clareamento caseiro com peróxido de carbamida 10%, tiras clareadoras de venda direta ao consumidor e clareamento de uso profissional com peróxido de hidrogênio 38% mostrou resultados semelhantes, entretanto o número de sessões necessárias para atingir o resultado desejado

variou, sendo que com uma concentração maior de peróxido de hidrogênio ocorre um clareamento mais rápido.

Braun et al. (2007) avaliaram a eficiência do clareamento dental ao empregar diferentes concentrações de peróxido de carbamida (10% e 17%). Os resultados indicaram que ambos obtiveram um clareamento similar após uma semana, porém o agente de maior concentração agiu de forma mais rápida.

O aumento nas concentrações de peróxido nos produtos para clareamento dental gera uma preocupação sobre os efeitos deletérios causados por este procedimento sobre os tecidos bucais, uma vez que o uso indiscriminado de agentes clareadores pode potencialmente causar alterações em todos os tecidos dentários, em especial sobre a polpa (Pugh et al., 2005). De acordo com Naik et al. (2006) o peróxido de hidrogênio é uma substância altamente reativa, que pode causar danos aos tecidos orais, principalmente quando está presente em altas concentrações e com exposição por tempo prolongado.

Quando o clareamento não é realizado adequadamente pode causar injúrias aos tecidos bucais, sendo que uma alta dosagem de peróxido de hidrogênio (30% a 35%) pode causar queimaduras no tecido gengival (Dahl, Pallesen, 2003; Naik et al., 2006; Ribeiro et al., 2006; Tredwin et al., 2006). De acordo com o estudo *in vitro* de Tipton et al. (1995), os agentes clareadores mostraram-se tóxicos para fibroblastos de origem gengival, e apresentam efeitos significantes na viabilidade, na morfologia, na proliferação e nas atividades funcionais, que são importantes à manutenção do tecido e da saúde deste.

2.2 Toxicidade de agentes clareadores

A difusão de agentes clareadores sobre os tecidos dentários explica dentre muitas coisas, o aparecimento de alterações nessas estruturas após o processo de clareamento. Todos os materiais ou agentes químicos desenvolvidos para utilização na área odontológica ou médica, antes de serem introduzidos no mercado, devem ser submetidos a testes preliminares de citotoxicidade e biocompatibilidade, os quais avaliam as propriedades biológicas e os fatores de risco. Especificamente para a área odontológica, a avaliação completa de um material dentário necessita, de acordo com a ANSI/ADA, ISO e *Federation Dentaire International*, passar por uma sequência de avaliações: testes iniciais, secundários e de aplicação clínica (pré-clínico). Os testes iniciais são realizados com a intenção de determinar os efeitos tóxicos de um material e inclui vários métodos, como por exemplo, o ensaio em cultura de células, devendo sempre simular as condições de uso no tecido de destino.

A interação dos materiais e seus componentes com as células em nível molecular é responsável por grande parte das reações teciduais, tais como inflamação, necrose, alterações imunológicas, mutagênicas e carcinogênicas. Além disso, os testes de citotoxicidade em cultura de células podem avaliar, também, os efeitos provocados por um determinado agente nas alterações metabólicas, no crescimento das células e nas modificações na permeabilidade da membrana. Desta maneira, testes iniciais foram recomendados e standardizados por importantes organizações, federações e associações internacionais, e se caracterizam, até os dias de hoje, como métodos essenciais para se avaliar a toxicidade de um material ou técnica nova.

Quando devidamente padronizados, os testes de citotoxicidade em cultura de células são facilmente reproduzidos,

proporcionam resultados rápidos e bastante sensíveis, além de possibilitarem o controle da maior parte das variáveis. Estes testes são de custo relativamente baixo, apontam de maneira preliminar o possível efeito citotóxico de um determinado material experimental ou de seus componentes isolados, e determinam a necessidade de dar continuidade na avaliação nos demais níveis de pesquisa, o que pode reduzir inclusive a necessidade de testes em animais (Costa, 2001). Por definição, citotoxicidade de um agente significa o efeito destrutivo que o mesmo provoca às células (Li, 1996).

Dahl e Becher (1995), avaliaram em ratos a toxicidade do peróxido de carbamida. Foram inoculados sistemicamente o peróxido de carbamida e uma preparação do gel Opalescence (Ultradent, South Jordan, UT, USA) que continha 10% de peróxido de carbamida e carbopol. Após o sacrifício dos animais e análise no microscópio de luz, os resultados mostraram que os dois géis clareadores provocaram ulcerações na mucosa gástrica do estômago. Em alguns animais, áreas de necrose e presença de células imaturas em atividade mitótica foram encontradas no tecido glandular.

Entretanto, Cohen e Chase (1979) analisaram cortes histológicos do tecido pulpar, de dentes humanos, submetidos ao clareamento com peróxido de hidrogênio 35% associado à aplicação de calor, e não encontraram evidências de alterações teciduais significantes. A análise histopatológica mostrou que as condições pulpares dos grupos experimentais foram semelhantes ao controle em todos os tempos pós-operatórios avaliados, sendo que a camada de odontoblastos estava intacta.

Robertson e Melfi (1980) investigaram histologicamente a resposta pulpar frente à aplicação de peróxido de hidrogênio 35% em dentes humanos jovens. Os resultados mostraram que nos grupos que receberam aplicação desse agente clareador houve resposta inflamatória leve, apresentando infiltrado inflamatório composto predominantemente

por neutrófilos e linfócitos, acompanhado de destruição celular generalizada. Assim como Nathanson (1997) afirmou que tanto o clareamento de consultório quanto o caseiro foram capazes de induzir desconforto pós-operatório em um número significativo de pacientes.

No trabalho de Bowles e Thompson (1986) foi avaliado, em nível molecular, o efeito do peróxido de hidrogênio e do calor, sobre enzimas presentes no tecido pulpar de dentes bovinos, as quais estão diretamente envolvidas no metabolismo de glicose e aminoácidos. De acordo com os autores as enzimas pulpares são significativamente inibidas pelo peróxido de hidrogênio, principalmente quando associado ao calor. Eles afirmam que estes dados sugerem que a combinação de calor e peróxido de hidrogênio tem potencial para causar danos biológicos.

Anderson et al. (1999), avaliaram a resposta pulpar após clareamento com peróxido de carbamida 10%. Utilizaram um marcador imunohistoquímico para verificar a presença da enzima HO-1 (Heme oxigenase-1). O aumento da HO-1 é uma reação de defesa contra os efeitos dos radicais livres, tal como o peróxido de hidrogênio. As análises imunohistoquímicas para a HO-1 mostraram resultado positivo para os odontoblastos adjacentes à superfície clareada. Porém, as células pulpares localizadas no centro da polpa e na região radicular, mostraram resultado imunohistoquímico negativo. Os resultados indicaram que a polpa responde ao estresse oxidativo em nível molecular, o que pode representar um componente inicial de resposta de defesa mediada por células específicas em locais estratégicos no tecido pulpar, em precedência à resposta inflamatória clássica.

Em um estudo clínico, Jorgensen e Carrol (2002), encontraram sensibilidade pós-operatória em metade dos pacientes avaliados após serem submetidos ao clareamento de uso caseiro supervisionado com peróxido de carbamida 15%, durante 4 semanas. Entretanto, Deliperi et al. (2004) testaram, *in vivo*, a associação do clareamento de consultório (peróxido de hidrogênio 35% e 38%)

associado ao clareamento caseiro (peróxido de carbamida 10%) e não verificaram diferença significativa no efeito clareador dos dois agentes de consultório. Também, não houve relato de sensibilidade por nenhum dos pacientes, fato que foi atribuído à limitação de uma hora de aplicação do agente, à formulação dos agentes clareadores (presença de nitrato de potássio e flúor no gel de peróxido de carbamida), à presença de 35% a 37% de água nos agentes clareadores de consultório e à ausência de fotoativação.

Fugaro et al. (2004) também avaliaram a resposta pulpar após o clareamento caseiro com gel peróxido de carbamida 10%. De acordo com os resultados da análise microscópica a maioria dos dentes não apresentou reações pulpares significantes. Além disso, as alterações pulpares desapareceram após duas semanas do tratamento clareador, sugerindo que o clareamento dental com peróxido de carbamida 10% é seguro para a polpa dental. Neste mesmo ano Gerlack et al. (2004) avaliaram a efetividade e a segurança no uso de tiras impregnadas com peróxido de hidrogênio a 10% (Whitestrips). Os resultados mostraram que o uso de Whitestrips promoveu significativa melhora da cor. O tratamento foi bem tolerado pelos pacientes, o que demonstrou segurança no uso.

Koulaouzidou et al. (1998) fizeram análise de diferentes diluições de dois agentes clareadores (um a base de peróxido de uréia e outro a base de peróxido de hidrogênio) sobre culturas de células de L929 (fibroblastos de pele de ratos) e BHK21/C13 (fibroblastos de rins de hamsters). Os autores concluíram que os dois agentes clareadores apresentaram citotoxicidade sobre os fibroblastos, sendo o peróxido de hidrogênio o mais tóxico.

Em 2001, Kinomoto et al. compararam a citotoxicidade do perborato de sódio com a do peróxido de hidrogênio nas células do ligamento periodontal *in vitro*. Para este estudo utilizaram um ensaio baseado na liberação de desidrogenase láctea de células com a membrana citoplasmática danificada. Os resultados mostraram que o

perborato de sódio parece ser mais seguro que o peróxido de hidrogênio no período de 24 horas; e que a mistura de perborato de sódio com peróxido de hidrogênio foi a mais citotóxica em todos os períodos de avaliação.

Aren (2003) avaliou os efeitos de dois agentes clareadores (Power Gel e Opalescence PF) sobre cultura de células de carcinoma mamário de ratas. Foram testados dois agentes clareadores: Power Gel (Kreativ) e Opalescence PF (Ultradent) que permaneceram em contato com as células por 24 horas. Através da coloração de azul de tripan para exclusão de células mortas, bem como da análise do crescimento e viabilidade celular em microscopia de luz invertida, o autor concluiu que ambos géis clareadores mostraram-se citotóxicos para essas células. Utilizando-se de células dessa mesma espécie animal, Ribeiro et al. (2005) avaliaram a citotoxicidade de agentes clareadores em células de linfoma de ratos (L5178Y) por intermédio dos testes de viabilidade celular e do cometa (utilizado para verificação de danos ao DNA celular). Os agentes clareadores a base de peróxido de hidrogênio a 35% (Whiteness HP e Lase peroxide) mostraram ser os mais lesivos às células; justamente por causarem maiores danos ao DNA e menores porcentagens de células viáveis ao fim do experimento do que os agentes clareadores a base de peróxido de hidrogênio a 16% (Clarigel Gold, Whitespeed, Nlte White Excel 2, Magic Bleaching).

Recentemente, Lima et al. (2009) avaliaram a citotoxicidade do gel de peróxido de carbamida 10% (Whiteness FGM), em diferentes diluições, sobre cultura de células de linhagem imortalizada MDPC-23. Os resultados mostraram que mesmo baixas concentrações do agente clareador foram capazes de produzir efeitos citotóxicos e que quando da utilização do peróxido de carbamida na diluição de 0,1%, ocorreu redução do metabolismo celular na faixa de 80%.

Utilizando essa mesma linhagem de células, Soares et al., em 2011, avaliaram a citotoxicidade do peróxido de carbamida 10% e

16%. Foi utilizado um modelo de câmara pulpar *in vitro*, onde os agentes clareadores eram colocados em contato com discos de esmalte e dentina e apenas a quantidade de clareador capaz de atravessar esses discos é que foi colocada em contato com as células. A viabilidade celular foi avaliada através do ensaio com MTT e ficou evidenciado que o peróxido de carbamida 10% não mostrou atividade citotóxica, enquanto que o 16% reduziu a viabilidade celular entre 40,32% e 26,61%.

Coldebella et al. (2009) estudaram o efeito indireto do peróxido de hidrogênio 35% com e sem fotoativação por luz halógena, sobre linhagem imortalizada de odontoblastos MDPC23. Os resultados mostraram que todos os grupos tiveram a viabilidade celular reduzida em mais de 60%, alterações na morfologia celular, verificada por microscopia eletrônica de varredura e redução em mais de 90% na dosagem total de proteínas, quando comparados às células do grupo controle, que não foram expostas ao gel clareador. Pode-se observar ainda que a luz halógena potencializou os efeitos tóxicos do agente clareador.

Em 2010, Dantas et al., avaliaram a citotoxicidade do peróxido de hidrogênio 35% em cultura primária de fibroblastos pulpare humanos, e o efeito da fototerapia com laser de baixa intensidade sobre essa toxicidade. Utilizando a metodologia empregada por Cavalcanti et al., (2005) de condicionamento do meio de cultura, o gel clareador foi colocado em contato com o meio de cultura na proporção de 0,2g/ml durante 30 minutos. Após esse período, as células foram expostas ao meio de cultura condicionado por 40 minutos, sendo esse meio substituído por meio fresco. As células dos grupos irradiados, receberam então a fototerapia e a viabilidade celular foi avaliada através do teste do MTT no período de 0 e 24 horas. Os resultados mostraram que o peróxido de hidrogênio 35% apresentou efeito citotóxico para as células e que a fototerapia com laser de baixa intensidade pode ser capaz de compensar esses efeitos.

Pazmandi et al. (2012) avaliaram o efeito modulatório do peróxido de hidrogênio sobre células dendríticas plasmacitóides. Os resultados obtidos demonstraram que a quantidade de 0,1, 1 e 10 μ M de peróxido de hidrogênio reduziu a viabilidade celular em 48%, 60% e 88% respectivamente, avaliada pela 7-aminoactinomicina por citometria de fluxo, o que gerou grande quantidade de espécies reativas de oxigênio.

Recentemente, Lima et al. (2013) estudaram os efeitos tóxicos do peróxido de carbamida 10% e peróxido de hidrogênio 35% sobre linhagem de odontoblastos MDPC23. Para este estudo foi utilizada uma câmara pulpar in vitro, onde os agentes clareadores foram aplicados sobre discos de esmalte/dentina. Foram estabelecidos quatro grupos experimentais: G1: Controle, G2: Peróxido de Carbamida 10% aplicado durante 8 horas por dia, durante 5 dias, G3: Peróxido de Carbamida 10% em uma única aplicação de 8 horas, G4: Peróxido de Hidrogênio 35% aplicado 3 vezes durante 15 minutos, totalizando 45 minutos. Após a aplicação dos agentes clareadores nos grupos 3 e 4, o extrato presente na câmara pulpar foi coletado e exposto às células por 1 hora. No grupo 2, a cada dia, no fim do período de exposição do gel clareador, o extrato foi coletado e exposto diariamente às células, durante 1 hora. Os resultados mostraram que as membranas celulares apresentaram danos em todos os grupos, sendo maiores no grupo 2. Esse grupo foi também o que apresentou maior redução de viabilidade celular e na atividade da fosfatase alcalina. O grupo 3 comportou-se de maneira mais satisfatória, enquanto que o grupo 4 apesar de reduzir a viabilidade celular, não mostrou efeito significativo na redução da atividade da fosfatase alcalina, comparado ao grupo controle.

Fernandes et al. (2013), avaliaram a citotoxicidade de agentes clareadores de uso interno sobre fibroblastos gengivais. O meio de cultura foi condicionado com os agentes clareadores por 30 minutos. Após este período, o meio condicionado foi substituído por meio de cultura fresco e a viabilidade celular foi verificada após 24 e 48 horas pelo

teste de MTT. O rank de citotoxicidade encontrado após 24 horas foi: perborato de sódio + água destilada > peróxido de hidrogênio 35% > perborato de sódio + peróxido de carbamida 20% > perborato de sódio + peróxido de hidrogênio 35% > peróxido de carbamida 20%. Os autores concluíram que todos agentes clareadores mostraram-se citotóxicos, diminuindo a viabilidade celular significativamente em relação ao grupo controle.

Ainda nesse ano, Lee et al. (2013) avaliaram o comportamento do peróxido de hidrogênio sobre culturas de células pulpares humanas. Os resultados mostraram que a dose de 1mM de peróxido de hidrogênio causou grande redução de viabilidade celular e produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), entretanto, esses efeitos foram amenizados pelo o uso de um antioxidante (Buteína).

2.3 Espécies Reativas de Oxigênio (ROS)

Na definição de espécies reativas de oxigênio (ROS) estão incluídas moléculas de oxigênio como o oxigênio singlete ($1O_2$), ácido hipocloroso (HOCl) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), bem como radicais de oxigênio tais como ânion superóxido (O_2^-), óxido nítrico (NO), radicais hidroxila (OH^-) e hidroperóxil (HO_2^-). Sabe-se que a fonte primária de ROS (peróxido de hidrogênio, ânion superóxido e radical hidroxila) dentro das células advém de mitocôndrias, citocromo P450 e peroxidases (Shackelford et al., 2000). Entretanto, ROS também são gerados de fontes externas como resultado da exposição à luz ultravioleta, radiação iônica, substâncias cromoterapêuticas e outros agentes (Shackelford et al., 2000; Schweikl et al., 2006).

ROS são instáveis e estão prontos para reagir com outros componentes (Baumgardner, Sulfaro, 2001). Como consequência do

metabolismo aeróbico fisiológico, apenas uma pequena quantidade de oxigênio sofre incompleta redução e assim porções menores de ROS são constantemente geradas em células e tecidos (Baumgardner, Sulfaro, 2001; Silveira, 2004; Demirci et al., 2008). Entretanto, a persistência desse estresse oxidativo pode causar sérios danos aos tecidos e muitas vezes, morte celular (Silveira, 2004).

Para prevenir o dano oxidativo, as células eucarióticas têm desenvolvido um complexo sistema de defesa de moléculas reguladoras das reações de oxirredução, que incluem antioxidantes não-enzimáticos e enzimáticos que atuam em conjunto para minimizar os efeitos de ROS no organismo (Baumgardner, Sulfaro, 2001; Silveira, 2004). Entretanto, o desequilíbrio na estabilidade das reações de oxirredução entre o ROS, gerado tanto internamente como externamente à célula, pode levar a morte celular via apoptose (Schweikl et al., 2006). A glutathione (GSH) é um dos principais sistemas antioxidantes não-enzimático. GSH serve como um substrato para peroxidase de glutathione para catalisar a redução de H_2O_2 em H_2O , sendo o aumento do seu índice responsável por aumentar a viabilidade e a proliferação celular. Além disso, a via de GSH pode ser relevante para a intervenção clínica (Krifka et al., 2012). Por exemplo, a Bultationa sulfoximina (BSO) inibe seletivamente a enzima do primeiro passo da síntese de glutathione peroxidase GSH conduzindo assim a depleção de GSH. Por outro lado, os precursores do aminoácido cisteína como 2-oxotiazolidina-4-carboxilato de etilo (OTC) ou N-acetilcisteína (NAC) deve abastecer síntese de GSH sob condições de estresse. Além de ser um derivado de cisteína, NAC, por ser uma fonte intracelular de grupos sulfidrílo, pode atuar como um limpador ROS direto. Estas funções relacionadas com a regulação redox poderia explicar o papel protector de NAC (Krifka et al., 2012).

Alguns materiais odontológicos são capazes de causar um aumento da produção de ROS nas células. Portanto, estudos têm sido

realizados para a verificação da geração de ROS em células eucarióticas frente aos mesmos (Rezende et al., 2007; Demirci et al., 2008). Nocca et al., em 2012 verificaram a citotoxicidade e produção de ROS do TEGDMA em diferentes concentrações e diluído em DMSO e Etanol em fibroblastos de camundongos 3T3-Swiss. Os autores concluíram que a utilização de solventes junto ao TEGDMA aumenta sua toxicidade e a produção de espécies reativas de oxigênio. Assim como Camargo et al., 2009 avaliaram os efeitos biológicos do hidróxido de cálcio (HC, Hydro C, Dentsply, Brasil), MTA cinza (Angelus, Brasil), MTA branco (Angelus, Brasil) e polímero da mamona (POM, Poliquil, Brasil) sobre cultura de células pulpares humanas transformadas (tHPc) e fibroblastos V79. A liberação de ROS foi determinada por citometria de fluxo e os resultados permitiram concluir que nenhum dos materiais testados foi capaz de produzir significativa produção de ROS, sendo o hidróxido de cálcio o material que apresentou pior comportamento biológico em relação aos demais. Seguindo essa mesma linha, Ülker et al. (2012) avaliaram a citotoxicidade e a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) de cimentos resinosos (Rely X Unicem Clicker (RX) (3 M ESPE, Seefeld, Germany), Maxcem (MC) (Kerr, Orange, CA, USA), Panavia F 2.0 (PF) (Kuraray, Okuyama, Japan), Bistite II DC (BII) (Tokuyama Dental Corporation, Tokyo, Japan) and BisCem (BC) (Bisco, Schaumburg, IL, USA)) em células humanas e bovinas transfectadas (tHPDC e tBPDC). A citotoxicidade foi avaliada pelo teste do Cristal Violeta e a mensuração de ROS pela citometria de fluxo. Os resultados mostraram que todos os cimentos testados mostraram comportamento biológico desfavorável, sendo citotóxicos e gerando ROS. Os autores concluíram ainda que em relação a citotoxicidade, as células bovinas foram mais susceptíveis a esse efeito deletério, em relação às células humanas. Por outro lado, a produção de ROS foi mais exacerbada nas células humanas.

2.4 Efeitos dos agentes clareadores na resposta inflamatória e imunológica

O tecido pulpar saudável é composto basicamente de células pulpares de origem mesenquimal, células vasculares, células nervosas e células dendríticas. Frente a uma reação inflamatória, esse tecido inevitavelmente é invadido por neutrófilos, seguido de macrófagos e linfócitos (McLachlan et al., 2004). Os macrófagos são células fagocitárias que fazem parte do sistema fagocitário mononuclear e são componentes do sistema imunológico natural. Eles se originam na medula óssea, circulam no sangue, amadurecem e tornam-se ativados em vários tecidos. (Ma et al., 2003; Beutler, 2004). Considerando as diferentes localizações, as principais funções dos macrófagos são de fagocitar microrganismos e de produzir citocinas que irão promover o recrutamento e a ativação de outras células inflamatórias. A ação destas citocinas tem início após a ligação a receptores específicos que provocam alteração na síntese do RNA e, conseqüentemente, de proteínas de diferentes células do organismo. Elas podem agir no local onde são sintetizadas no organismo ou ter ação distante, quando são secretadas e destinadas à circulação. Estes mediadores da resposta inflamatória podem ser interleucinas, como IL-1 β ; IL-6; IL-12, e fator de necrose tumoral (TNF- α), dentre outros, (Kraychete et al., 2006; Janeway et al., 2007). Como células acessórias na imunidade adquirida, os macrófagos exibem o antígeno em uma forma que possam ser reconhecidos pelos linfócitos T e secretam proteínas de membrana, para a ativação de linfócitos T. Na imunidade celular, as células T estimuladas pelo antígeno ativam os macrófagos para destruírem os microrganismos e promovem a fagocitose dessas vias receptoras para anticorpos na superfície dos macrófagos (Janeway et al., 2007).

Sabe-se que espécies reativas de oxigênio (ROS) são considerados mediadores responsáveis pela morte celular, por apoptose e necrose. O processo de apoptose é mediado por uma família de proteases conhecida como caspases. A ativação dessa enzima pode ocorrer pelas vias intrínseca e extrínseca da apoptose. A ativação da via intrínseca é desencadeada por uma série de fatores, como estresse oxidativo, o que afeta a permeabilidade da membrana mitocondrial. A via extrínseca pode ser ativada pela ligação de moléculas ligantes, como TNF α nos respectivos receptores na superfície da célula, capazes de ativar as caspases (Rincheval et al., 2012). Por isso, uma produção excessiva de TNF α bem como de ROS, como o peróxido de hidrogênio, pode atuar na ativação da morte celular programada, além de causar danos genéticos (Li et al., 2012).

Os processos inflamatórios são iniciados pelo sistema imune inato, as células de defesa percebem a presença de patógenos ou produtos microbianos através da expressão de receptores de reconhecimento. Seguindo o encontro com os seus ligantes específicos, inicia-se uma via de transdução de sinal, que conduz à ativação da transcrição. Fatores que, por sua vez, regulam a expressão de citocinas pró-inflamatória e moléculas coestimuladoras que são importantes para a ativação da resposta inata e adaptativa.

O Lipopolissacarídeo (LPS) presente na membrana externa das bactérias Gram-negativas, desempenha importante função da interação do patógeno com o hospedeiro. Essa endotoxina constitui um antígeno não-específico capaz de ativar a cascata do sistema complemento (Salles et al., 1999) O LPS também induz os macrófagos a secretarem citocinas, espécies reativas de oxigênio, óxido nítrico, fator ativador de plaquetas e prostaglandinas. Para que haja a ativação celular, é necessária a ligação do LPS à célula pela ligação do complexo LPS-LBP (Lipopolissacarídeo- Proteína ligante de lipopolissacarídeo) ao CD14. Os monócitos e macrófagos possuem receptores de superfície

CD14, sendo capazes de se ligarem ao complexo formado pela proteínas carregadoras e a endotoxina (Lynn, Golenbock, 1992; Salles et al., 1999).

O complexo de histocompatibilidade (MHC) de classe I e II constitui-se de importantes moléculas apresentadoras de antígenos. A resposta imunológica mediada por células T é induzida quando a apresentação de um antígeno é combinado com um sinal estimulatório, fornecida por moléculas co-estimulatórias, como o CD80 e CD86 . A molécula de adesão intercelular (CD54) é uma outra proteína expressa sobre a superfície de uma variedade de tipos de células, pertencendo à família de supergenes da imunoglobulina sendo responsáveis pelas interações adesivas célula-célula e célula-matriz (McGlinchey et al., 2004). A expressão de CD40 nas células apresentadoras de antígeno, como os monócitos e células dendríticas está agora bem estabelecida. A ligação do CD40 à essas células resulta na secreção de múltiplas proteínas e citocinas. Adicionalmente, a interação entre CD40 e CD40L (CD154) induz a expressão de moléculas co-estimuladoras, tais como CD54, CD58, CD80, e CD86 (Galy, Spits, 1992; Van Kooten, Banchereau, 2000; Gu et al., 2012).

A liberação de citocinas pró-e anti-inflamatórias bem como a expressão de antígenos de superfície é controlada por vias regulatórias. Conforme já referido, a secreção citocinas é estimulada por LPS, e esta é a endotoxina também capaz de induzir a expressão de antígenos de superfície celular. Estudos sugerem que a liberação de espécies reativas de oxigênio (ROS) apresentam um elo entre as vias que levam à ativação de citocinas e de antígenos de superfície celular (Rincheval et al., 2012; Zanoni et al., 2012). Por isso, é válida a hipótese de que o peróxido de hidrogênio também pode afetar a transdução de sinal de vias celulares que levam à secreção de TNF α , bem como a expressão de alguns dos vários antígenos de superfície celular de células do sistema imune inato.

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo desse estudo foi avaliar a citotoxicidade, produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), expressão de marcadores celulares e produção de TNF α em culturas de macrófagos RAW 264.7 expostos a agentes clareadores (Peróxido de Hidrogênio 40% e Peróxido de Carbamida 20%).

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 Cultivo das células

Foram utilizados macrófagos de linhagem imortalizada RAW 264.7. As células foram cultivadas em meio de cultura RPMI (Desenvolvido pelo Instituto Roswell Park Memorial), suplementado com soro fetal bovino a 10%, piruvato de sódio a 1% e solução antibiótica-antimicótica a 1% (Gibco, Germany). Em seguida, foram semeadas em frascos de cultivo e, após a subconfluência da camada de células, estas foram destacadas com auxílio de solução de EDTA 5mM diluída em solução salina de tampão de fosfato (PBS) (Gibco, Germany,) com auxílio de um scrap. Em seguida, essas células foram semeadas em novo frasco. Após as passagens necessárias de subcultivo, as células foram semeadas em placas com 96 poços, onde receberam posteriormente os meios de cultura contendo os materiais a serem testados (Figura 1). Essas etapas serão descritas a seguir.

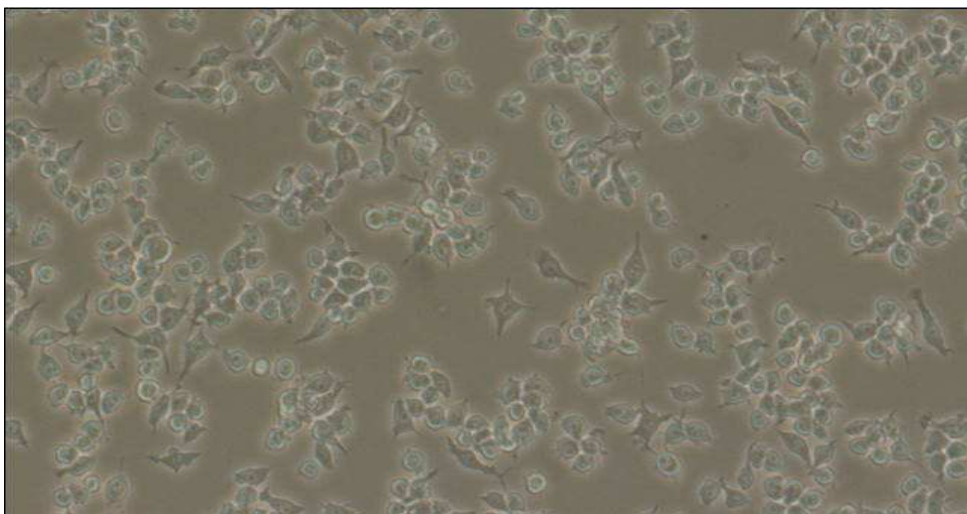


Figura 1 - Células RAW 264.7.

4.1.1 Descongelamento

Todos os procedimentos foram realizados dentro da capela de fluxo laminar. Em um frasco grande para cultura de célula (garrafa 75 cm² – 270 ml), foram pipetados 10 ml de meio de cultura. Esse procedimento foi realizado com antecedência, para que a tensão superficial do frasco e do meio fosse quebrada. Paralelamente, em um tubo de ensaio (Prolab, São Paulo, Brasil) de 15 ml, foram colocados 10 ml de meio de cultura, que serviu para neutralizar o DMSO (dimetilsulfóxido) (Sigma Aldrich Co., Germany), substância na qual a célula é congelada e que em temperatura ambiente torna-se tóxica para as mesmas. No livro de registros do banco de células foram selecionados o puxador e a caixa do tambor de nitrogênio (Thermo Fisher Scientific Inc, United States) que continham as células desejadas. Um tubo criogênico foi removido e levado imediatamente para o banho-maria (Eppendorf, Germany) até o descongelamento do mesmo. O tubo foi levado rapidamente para capela de fluxo laminar e o seu conteúdo despejado no

tubo de ensaio contendo meio de cultura. O tubo de ensaio foi então levado à centrífuga (Eppendorf, Germany) por 5 minutos a 1000 rpm, onde observou-se a formação de um precipitado de células, chamado de *pellet*. Na capela o meio de cultura sobrenadante foi aspirado e as células ressuspensas em 1 ml de meio fresco e então colocadas no frasco para cultura de células previamente preparado. O frasco foi levado ao microscópio de luz invertida (Leica, Germany) para verificação da presença de células e posteriormente à estufa atmosférica a 37° C com tensão de CO₂ 5% (Thermo Fisher Scientific Inc, United States).

4.1.2 Troca de meio

A cada 48 horas o meio de cultura foi trocado. As células foram removidas da estufa e verificadas no microscópio. O meio de cultura foi aspirado e em seguida as células foram lavadas com PBS para remoção de células mortas. Um novo meio de cultura foi então adicionado ao frasco, o qual foi levado novamente para a estufa

4.1.3 Subcultura

Quando as células cresceram a ponto de ocupar quase todo o frasco (80% de confluência) foi necessário realizar subcultura, passando as células de um frasco para dois ou mais, de acordo com o crescimento celular. As células removidas da estufa foram levadas à capela de fluxo laminar, onde o meio de cultura presente no frasco de cultivo foi retirado com auxílio de um pipetador automático (High Tech Lab, Poland). As células foram então lavadas com 5 ml de PBS que foi

aspirado em seguida. Foram adicionados ao frasco 5 ml de PBS EDTA 5mM, utilizada para destacar as células com auxílio de um *scrap*. Estando as células prontas, foi adicionado ao frasco 10 ml de meio de cultura fresco. Todo este conteúdo foi levado à centrífuga a 1000 rpm por 6 minutos para obtenção do *pellet*. O sobrenadante foi novamente aspirado e as células ressuspensas em 1 ml de meio fresco e após bem homogeneizada, a suspensão foi dividida em dois ou mais frascos de mesmo tamanho, contendo 30 ml de meio de cultura, preparados previamente. Os frascos foram levados novamente à estufa, onde permaneceram até a troca de meio e/ou realização de uma nova subcultura. Esse procedimento foi realizado até que as células estivessem na 15ª passagem e em quantidade suficiente para realização da contagem e do plaqueamento.

4.1.4 Contagem de células

A contagem de células foi realizada antes do plaqueamento a fim de que a mesma quantidade de células fosse colocada em cada poço das placas. Foram realizados os mesmos passos da subcultura até a obtenção do *pellet*, sendo que nesse caso, as células foram ressuspensas em 10 ml de meio fresco. Dessa suspensão, foram retirados 10 µl, os quais foram levados à câmara de Neubauer (Labor Optik GmbH, Germany), que foi levada ao microscópio de luz invertida para realizar a contagem das células presentes nos quatro quadriláteros periféricos (Figura 2).

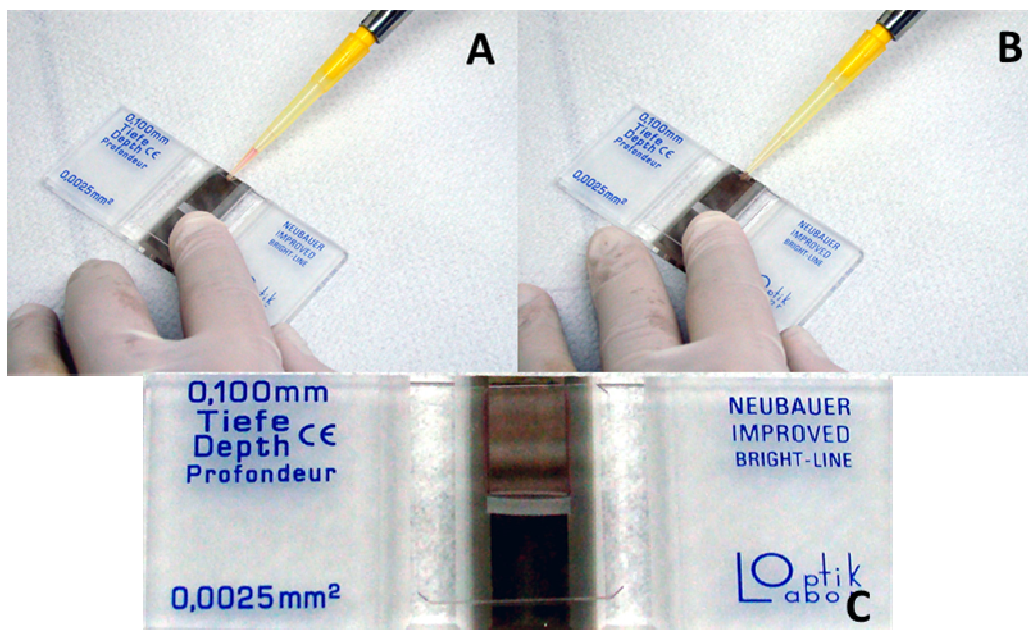


Figura 2 – A e B) Colocação de 10 µl da suspensão celular na câmar de Neubauer; C) Câmara de Neubauer pronta para ser levada ao microscópio.

Para obtenção da quantidade de células por ml, foi utilizada a seguinte fórmula:

$$C \times 10^4 = n^\circ \text{células/ml}$$

Onde **C** corresponde à média das células viáveis encontradas nos quadriláteros periféricos. Foram plaqueadas 2000 células em 200 µl de meio em cada poço.

4.2 Preparo dos extratos originais

Foram utilizados dois agentes clareadores: Peróxido de Hidrogênio 40% (PH) (Opalescence Boost 40%; Ultradent Products, South

Jordan, Utah, USA) e Peróxido de Carbamida 20% (PC) (Opalescence PF 20%; Ultradent Products, South Jordan, Utah, USA). Para obtenção dos meios de culturas condicionados, 0,2g de cada gel foi colocado em contato com 1 ml de meio de cultura fresco (Cavalcanti et al., 2005) em um *eppendorf*, permanecendo em estufa atmosférica de CO₂ por 1 hora. Após esse período, o conteúdo foi agitado em um agitador de tubos *vortex* por 10 segundos e centrifugado a 14 000 rpm por 1 minuto, a fim de se obter um *pellet* do gel clareador. Em seguida, o meio de cultura sobrenadante foi removido, sendo colocado em outro *eppendorf* e então considerado o extrato original do meio de cultura condicionado. A partir deste, foram realizadas diluições do mesmo para realização dos testes descritos a seguir. A solução de peróxido de hidrogênio pura a 10% (H₂O₂) e diluições a partir desta, foram utilizadas como controles positivos (Figura 3).

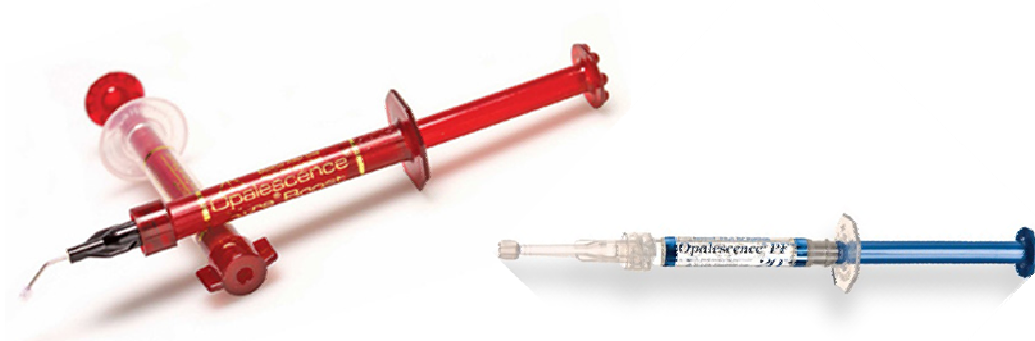


Figura 3 – Agentes Clareadores: Opalescence Boost 40% e Opalescence PF 20%.

4.3 Preparo dos Aditivos

Para cada condição experimental foram utilizadas substâncias aditivas aos agentes clareadores que funcionaram como reguladores do ciclo da glutathione, envolvido no sistema antioxidante: N-

acetilcisteína (NAC) (Sigma Aldrich Co., Germany) a 5 mM e Bultationa sulfoximida (BSO) (Sigma Aldrich Co., Germany) a 50 μ M.

4.4 Avaliação da viabilidade celular pelo Método do MTT

As células foram cultivadas em placas de 96 poços contendo 2000 células por poço em 200 μ l de meio RPMI, permanecendo em estufa atmosférica de CO₂ por 48 horas. Após esse período, diluições dos extratos originais dos agentes clareadores foram colocados em contato com as mesmas, com e sem aditivos (NAC 5mM e BSO 50 μ M) em estufa pelos períodos de: 1 hora de contato; 1 hora de contato + 23 horas de recuperação celular (após o período de contato, o meio de cultura condicionado foi substituído por meio de cultura fresco) e 24 horas de contato (Quadro 1). A viabilidade celular foi avaliada através da coloração pelo MTT, que é reduzido pelas células vivas, adquirindo coloração azul. A avaliação foi realizada pela mensuração da atividade mitocondrial celular através do brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolium (MTT). Este ensaio baseia-se na medida do dano induzido pela substância no metabolismo celular de glicídeos, usualmente através da atividade de desidrogenases. A atividade celular é quantificada pela redução do MTT. As reações com o MTT são usadas para localizar a atividade de desidrogenases presentes em células viáveis. O sal de tetrazólio não reage diretamente com as desidrogenases, mas com os produtos da reação do NADH ou NADPH (formas reduzidas da nicotinamida adenina dinucleotídeo e nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfatada, respectivamente, que atuam na glicólise e no ciclo de Krebs) que reduzem o MTT.

O ensaio com MTT foi realizado com o preparo do reagente, diluindo-se 0,5 mg de MTT (Sigma Aldrich Co., Germany) em 1

ml de solução de PBS. Como a solução é sensível a luz, esta foi mantida protegida com papel alumínio. O meio de cultivo foi removido das placas e 100 µl da solução de MTT foram adicionados em cada poço. Cada placa foi então envolvida em papel alumínio e permaneceu em estufa por uma hora. Após este período, o MTT foi removido e foram adicionados 100 µl de DMSO (Sigma Aldrich Co., Germany) em cada poço, permanecendo na estufa por 10 minutos. Ao término deste período o conteúdo dos poços foi agitado por mais 10 minutos em um agitador de placas (Asys Hitech GmbH, Austria) e a placa levada à leitora (Asys Hitech GmbH, Austria) previamente programada. A quantificação da inibição enzimática foi realizada em espectrofotômetro em comprimento de onda de 570 nm. Foram realizados pelo menos quatro experimentos independentes.

Quadro 1- Divisão dos grupos experimentais para os testes: MTT e KVT

Período de Avaliação	Concentrações dos materiais em teste
1 hora	H ₂ O ₂ : 0,001%; 0,003%; 0,005%; 0,01%; 0,025%; 0,05%; 0,075%; 0,1%.
	PH: 1:10000; 1:7500; 1: 5000; 1:4000; 1:3000; 1:2000; 1:1000; 1:500; 1:100; 1:10
	PC: 1:10000; 1: 1000; 1:750; 1:500; 1:250; 1:100; 1:50; 1:10
1 hora + 23 horas	H ₂ O ₂ : 0,001%; 0,002%; 0,003%; 0,004%; 0,005%; 0,01%.
	PH: 1:10000; 1:7500; 1: 5000; 1:4000; 1:3000; 1:2000; 1:1000; 1:500; 1:100; 1:10
	PC: 1:10000; 1: 1000; 1:750; 1:500; 1:250; 1:100; 1:50; 1:10
24 horas	H ₂ O ₂ : 0,001%; 0,002%; 0,003%; 0,004%; 0,005%; 0,01%.
	PH: 1:10000; 1:7500; 1: 5000; 1:4000; 1:3000; 1:2000; 1:1000; 1:500; 1:100; 1:10
	PC: 1:10000; 1: 1000; 1:750; 1:500; 1:250; 1:100; 1:50; 1:10

4.5 Avaliação da Sobrevivência celular pelo Teste Cristal Violeta

A sobrevivência celular foi determinada pelo teste de cristal violeta (KVT – Kristal Violet Test). As células foram cultivadas em placas de 96 poços da mesma maneira como foi descrito para o ensaio

com MTT, assim como os materiais em teste foram utilizados da mesma maneira, conforme descrito no quadro 1. Para realização deste ensaio, que determina a quantidade de massa celular presente, as culturas celulares foram fixadas com 150 µl de glutaraldeído (1% em água destilada) em cada poço por 30 minutos. Posteriormente, o glutaraldeído foi removido e as células foram lavadas duas vezes com 200 µl de PBS, por poço. O PBS foi então descartado e as mesmas foram coradas, adicionando 150 µl de cristal violeta (0,02% em água destilada) em cada poço, deixando em contato por 15 minutos. Após este período, as culturas celulares foram lavadas em água corrente até que todo o corante fosse removido. O remanescente de água presente nas placas foi também removido, e quando as placas estavam completamente secas, foi acrescentado 180 µl de álcool 70% por poço, para dissolver o corante (cristal violeta 0,02%). As placas permaneceram em um agitador de placas (Asys Hitech GmbH, Austria) durante duas horas. As densidades ópticas foram mensuradas em um espectrofotômetro com comprimento de onda ajustado em 600 nm. Foram realizados pelo menos quatro experimentos independentes.

4.6 Produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS)

A liberação de ROS em cultura de células foi quantificada utilizando uma sonda fluorescente sensível a oxidação (H₂DCF-DA, Invitrogen Molecular Probes, Karlsruhe, Germany). Os resultados advêm da atividade intracelular na formação do 2,7- diclorodihidrofluoresceína (DCFH), um composto não fluorescente o qual emite fluorescência quando é oxidado para 2,7-diclorodihidrofluoresceína-diacetato (DCF-DA).

Para esse experimento, células RAW 264.7 foram cultivadas em placas de 6 poços, contendo 50 000 células em cada poço,

permanecendo em estufa atmosférica de CO₂ por 48 horas. Após esse período, as células foram expostas aos agentes clareadores e ao controle positivo TEGDMA (Trietilenoglicol dimetacrilato) por diferentes períodos e concentrações de acordo com o quadro 2:

Quadro 2- Divisão dos grupos experimentais para o teste de ROS

Período de Avaliação	Concentrações dos materiais em teste
1 hora	H ₂ O ₂ : 0,001%; 0,005%
	PH: 1:2000; 1:1000; 1:500
	PC: 1:500; 1:100; 1:50
	TEGDMA: 1 e 3 mM
1 hora + 23 horas	H ₂ O ₂ : 0,001%; 0,005%
	PH: 1:2000; 1:1000; 1:500
	PC: 1:500; 1:100; 1:50
	TEGDMA: 1 e 3 mM
24 horas	H ₂ O ₂ : 0,001%; 0,005%
	PH: 1:2000; 1:1000; 1:500
	PC: 1:500; 1:100; 1:50
	TEGDMA: 1 e 3 mM

A escolha das concentrações dos materiais para realização do teste de ROS foi realizada após análise dos resultados dos testes MTT e KVT. Optou-se pela utilização de concentrações onde as células mostraram-se afetadas pelos materiais, porém em quantidade e viabilidade que permitisse a realização do teste. Após a aplicação das diluições, as células foram incubadas em estufa com 5% de CO₂ a 37°C de acordo com o período de exposição. 30 minutos antes de acabar o tempo de exposição aos materiais em teste, foi acrescentado 2 µl de

DCFH em cada poço. Nesse momento a luz da capela de fluxo laminar foi desligada, uma vez que o DCFH é sensível à luz. As células foram então novamente incubadas em estufa atmosférica por 30 minutos. Em seguida, foram lavadas com 1 ml de PBS por poço. Foi então adicionado 1 ml de PBS EDTA 5mM em cada poço, incubando as placas em estufa atmosférica por 5 minutos. Essa solução é utilizada para realizar o destacamento das células, permitindo que as mesmas fossem removidas do fundo das placas com facilidade. Após esse período, as células já destacadas, foram ressuspensas em 1,5 ml de PBS gelado e centrifugadas em tubos de ensaio a 600 rpm por 5 minutos. O *pellet* celular formado, foi lavado e centrifugado duas vezes com PBS gelado. Após a última centrifugagem, as células foram ressuspensas em 250 μ l de PBS gelado. Imediatamente após a ressuspensão, a fluorescência do DCF-DA foi determinada por citometria de fluxo (BD Biosciences FACSCanto, Heidelberg, Germany) com excitação do comprimento de onda de 495 nm e emissão do comprimento de onda de 530 nm (FL-1). (Figura 4). A média da intensidade de fluorescência foi obtida por um histograma estatístico, utilizando o programa BD FACS Diva. Pelo menos quatro experimentos independentes foram realizados para cada material. As médias das intensidades fluorescentes foram comparadas ao grupo controle negativo (fator de fluorescência =1,0).

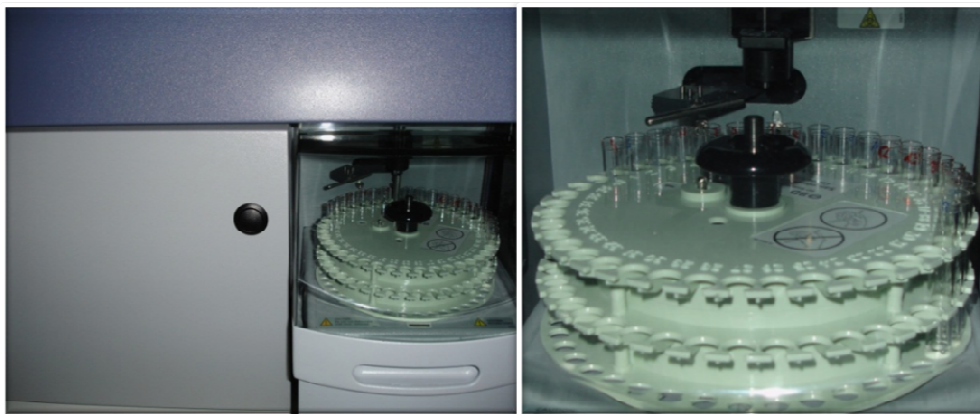


Figura 4 – Citômetro de Fluxo.

4.7 Detecção de Marcadores de superfície: CD14, CD40 e CD54

Para realização da avaliação da presença de marcadores celulares por citometria de fluxo, foram utilizadas células RAW 264.7, sendo estas cultivadas em placas de 6 poços, contendo 50.000 células em cada poço, permanecendo em estufa atmosférica de CO₂ por 48 horas. Após esse período, as células foram expostas aos agentes clareadores com e sem o controle positivo por LPS 0,1 µg/ml (Lipopolissacarídeo) em diferentes concentrações, de acordo com o quadro 3:

Quadro 3- Divisão dos grupos experimentais para os testes de Marcadores de Superfície e ELISA

Período de Avaliação	Concentrações dos materiais em teste
24 horas	H ₂ O ₂ : 0,001%; 0,002%; 0,003%; 0,004%; 0,005%
	PH: 1:4000; 1:3000; 1:2000; 1:1000
	PC: 1:1000; 1:500; 1:250; 1:100; 1:50

Para a realização desse teste, optou-se por manter as concentrações dos materiais utilizadas para realização do teste de ROS. Entretanto, após análise da produção de ROS, optou-se por acrescentar diluições para permitir melhor análise na detecção dos marcadores de superfície. Após o período de contato das células com os materiais em teste, as células foram lavadas com 1 ml de PBS e em seguida, destacadas com 1 ml de PBS EDTA 5 mM, permanecendo em estufa atmosférica por 5 minutos. A remoção foi realizada pela utilização de 1 ml de PBS gelado, movendo as células para tubos de ensaio, onde foram

centrifugadas a 600 rpm por 3 minutos. Após obtenção do *pellet*, as células foram ressuspensas em 1 ml de solução FACS (contendo 10 % de PBS, 1% de soro fetal bovino e 1% de sódio ácido) em cada tubo de ensaio. Em seguida, foram divididas em três tubos diferentes, nos quais receberam diferentes anticorpos monoclonais que reconhecem antígenos de superfície da membrana da célula. Em cada tubo foi adicionado diferentes anticorpos monoclonais anticamundongo em uma diluição final de 1:10 (anti-CD14, antiCD40 e antiCD54), permanecendo em contato com as células por 30 minutos na ausência de luz e refrigerados. Após esse período, as células foram lavadas duas vezes com solução de FACS e então levadas ao citômetro de fluxo. A média da intensidade de fluorescência foi obtida por um histograma estatístico, com utilização do programa BD FACS Diva. Pelo menos quatro experimentos independentes foram realizados para cada material.

4.8 Avaliação da produção de TNF α por ELISA

A produção de citocina TNF- α foi avaliada por ensaios imunoenzimáticos (ELISA) utilizando os Kits ELISA Development System específicos para a citocina (BD Pharmingen, Heidelberg, Germany).

Para realização desse teste, foram colhidos os sobrenadantes das células utilizadas para a realização do teste de marcadores de superfície. Os sobrenadantes foram recolhidos imediatamente ao fim de cada período de exposição das células aos clareadores, colocados em *ependorfs* e mantidos a -80°C até a realização do teste.

Placas de microtitulação de 96 poços foram sensibilizadas com anticorpos de captura anti-TNF- α (BD Pharmingen, Heidelberg, Germany) e mantidas *overnight* em refrigeração a 4°C . No dia seguinte,

as placas foram lavadas 3 vezes com PBS contendo Tween 20 (*Washing Buffer*). Em seguida, foi adicionado em cada poço 200 μ L da solução *Assay diluent* (PBS + Soro Fetal Bovino), permanecendo por 1 hora em temperatura ambiente. Após esse período, as placas foram novamente lavadas por 3 vezes com *Washing Buffer* e receberam então os sobrenadantes da cultura de células (100 μ L por poço) e os padrões da citocina com concentrações conhecidas (curva-padrão). Os testes foram realizados em duplicata. Após incubação por duas horas, as placas foram lavadas por 5 vezes com *Washing Buffer* e depois foram acrescentados os anticorpos de detecção anti-TNF- α . Após 1 hora em temperatura ambiente, as placas foram lavadas por 7 vezes com *Washing Buffer* e a reação foi então revelada com solução contendo substrato cromogênico e peróxido de hidrogênio. A reação foi bloqueada após 30 minutos com ácido sulfúrico 2 N. As densidades ópticas foram lidas no leitor de microplacas (Asys Hitech GmbH, Austria) com comprimento de onda de 450 nm. Os níveis de TNF- α presentes nos sobrenadantes das culturas de macrófagos foram quantificados. Os valores obtidos foram convertidos em picogramas por mililitro (pg/ml) e o limite de detecção mínimo, utilizando a curva padrão foi de 15,7 pg/ml. Foram realizados pelo menos quatro experimentos independentes.

4.9 Análise Estatística

A análise estatística de todos os experimentos foi realizada através do teste de Mann Whitney com nível de significância a 5% (SPSS 15.0, SPSS, Chicago, IL, USA).

5 RESULTADOS

5.1 Avaliação viabilidade celular

Os resultados obtidos a partir da leitura em espectrofotômetro do teste MTT, correspondem indiretamente à atividade do metabolismo das células, pois representam a inibição da atividade da succinil desidrogenase, indicativa de função mitocondrial. Os resultados presentes nas figuras 5, 6 e 7 representam graficamente as concentrações dos agentes clareadores que reduziram a viabilidade celular a 50%, comparado ao grupo controle, através dos valores EC50 (Concentração Efetiva) nos diferentes períodos de avaliação.

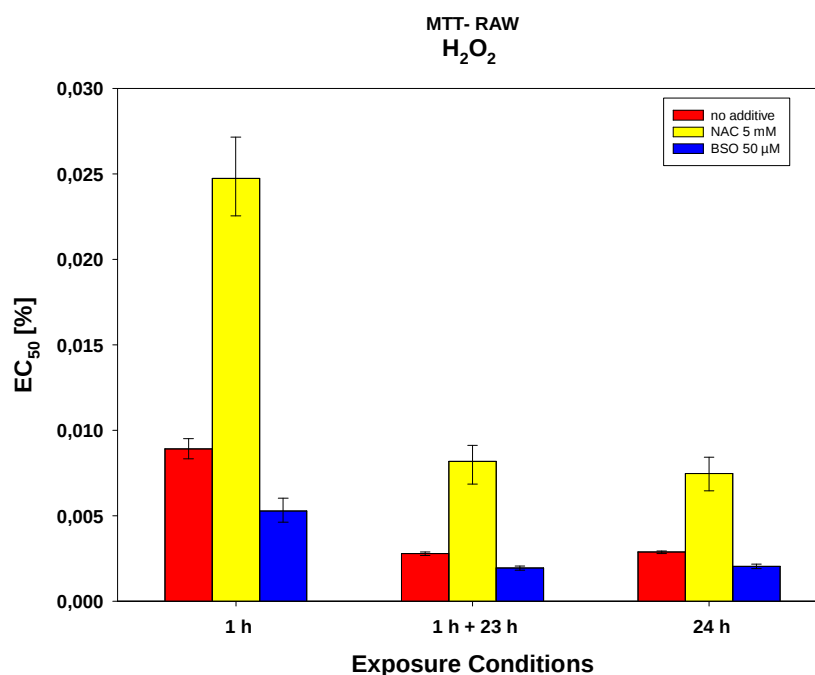


Figura 5 – Gráfico de barras ilustrando o efeito do H_2O_2 10% na viabilidade celular em diferentes períodos de avaliação.

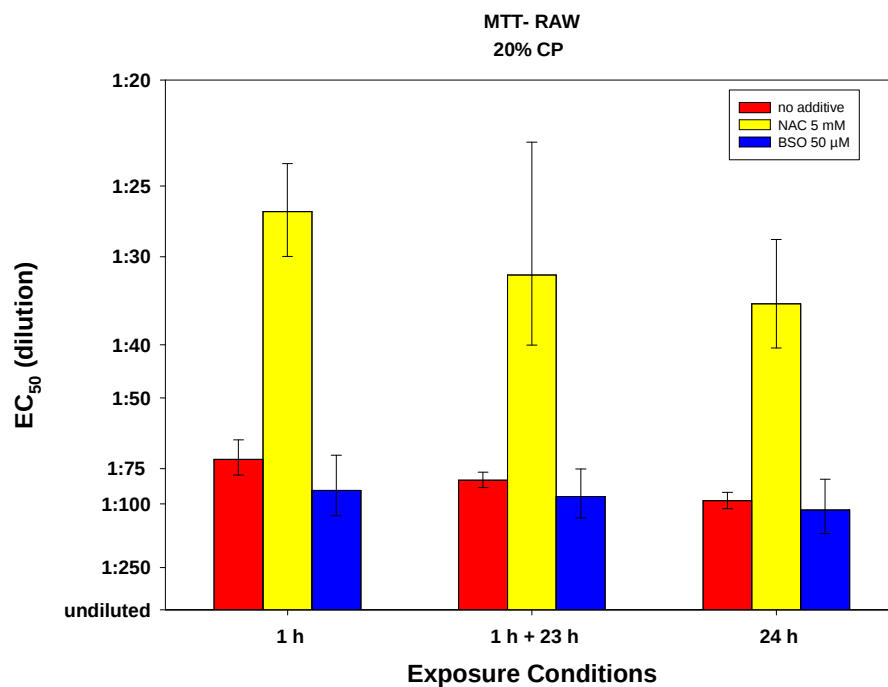


Figura 6 – Gráfico de barras ilustrando o efeito do Peróxido de Carbamida 20% na viabilidade celular em diferentes períodos de avaliação.

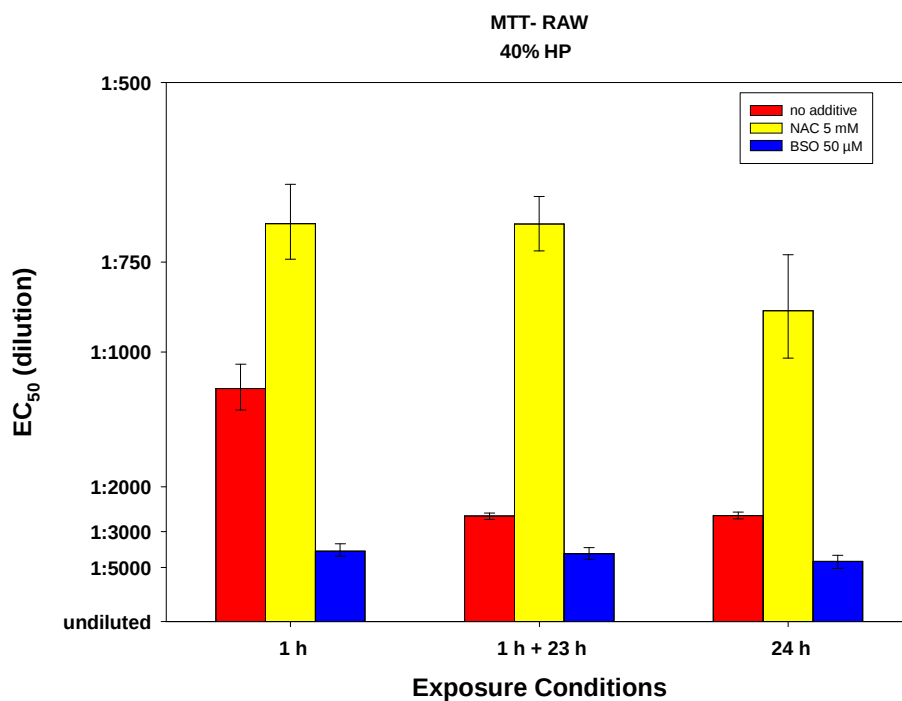


Figura 7 – Gráfico de barras ilustrando o efeito do Peróxido de Hidrogênio 40% na viabilidade celular em diferentes períodos de avaliação.

A análise estatística foi realizada por meio do teste de Mann Whitney com nível de significância a 5%. Os resultados mostraram que todas as diluições do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) 10% utilizadas neste estudo, reduziram a viabilidade celular significativamente em relação ao grupo controle, em todos os períodos de avaliação ($p=0$), com exceção das concentrações de 0,001% e 0,003% no período de 1 hora e 0,001%, no período de 1 hora + 23 horas que mostraram-se não significante em relação ao grupo controle ($p\geq 0,005$). A citotoxicidade do peróxido de carbamida 20% foi estatisticamente significativa em relação ao grupo controle a partir da diluição 1:500 no período de 1 hora ($p=0,032$ para a diluição 1:500; todas as demais, $p < 0,05$) e 1:1000 nos períodos de 1 hora + 23 horas ($p=0,014$ para a diluição 1:1000; todas as demais, $p < 0,05$) e 24 horas de avaliação ($p=0$ para a diluição 1:1000; todas as demais, $p < 0,05$). Já o peróxido de hidrogênio 40% reduziu a viabilidade celular significativamente em relação ao grupo controle a partir da diluição 1:1000 no período de 1 hora e em todas as diluições no período de 1 hora+ 23 horas e 24 horas ($p= 0$). (Tabelas 1,2 e 3). Verificou-se ainda que a NAC aumentou a viabilidade celular, em todas as diluições e concentrações dos materiais testados, enquanto que o BSO diminuiu esta viabilidade (ANEXO A).

Tabela 1- Teste de Mann Whitney comparando o Grupo Controle com H₂O₂ 10% nos três períodos de avaliação no ensaio MTT

Concentrações do H ₂ O ₂ X Grupo Controle		
1 hora	1 hora + 23 horas	24 horas
0,001% p= ns	0,001% p=ns	0,001% p=0
0,003% p= ns	0,002% p=0	0,002% p=0
0,005% p= 0	0,003% p=0	0,003% p=0
0,01% p=0	0,004% p=0	0,004% p=0
0,025% p=0	0,005% p=0	0,005% p=0
0,05% p=0	0,01% p=0	0,01% p=0
0,075% p=0	-	-
0,1% p=0	-	-
ns: Valor não significante (p≥0,05)		

Tabela 2- Teste de Mann Whitney comparando o Grupo Controle com Peróxido de Carbamida 20% nos três períodos de avaliação no ensaio MTT

Diluições Peróxido de Carbamida 20% X Grupo Controle			
Diluições	1 hora	1 hora + 23 horas	24 horas
1: 10000	p=ns	p=ns	p=ns
1: 1000	p=ns	p= 0,014	p=0
1: 750	p=ns	p= 0,022	p= 0,003
1:500	p= 0,032	p= 0,016	p= 0,03
1:250	p= 0,006	p= 0,016	p=0
1:100	p=0	p=0	p=0
1:50	p=0	p=0	p=0
1:10	p=0	p=0	p=0

ns: Valor não significante ($p \geq 0,05$)

Tabela 3- Teste de Mann Whitney comparando o Grupo Controle com Peróxido de Hidrogênio 40% nos três períodos de avaliação no ensaio MTT

Diluições Peróxido de Hidrogênio 40% X Grupo Controle			
Diluição	1 hora	1 hora + 23 horas	24 horas
1:10000	p= 0,001	p=0	p=0
1:7500	p=ns	p=0	p=0
1:5000	p=ns	p= 0,007	p=0
1:4000	p=ns	p=0	p=0
1:3000	p=ns	p=0	p=0
1:2000	p=ns	p=0	p=0
1:1000	p=0	p=0	p=0
1:500	p=0	p=0	p=0
1:100	p=0	p=0	p=0
1:10	p=0	p=0	p=0

ns: Valor não significante ($p \geq 0,05$).

5.2 Avaliação da sobrevivência celular

Os resultados obtidos com o teste KVT, mostram através da leitura em espectrofotômetro, a massa celular remanescente, indicando portanto a taxa de sobrevivência e proliferação celular. Os resultados presentes nas figuras 8, 9 e 10 representam graficamente as concentrações dos agentes clareadores que reduziram a viabilidade

celular a 50%, comparado ao grupo controle, através dos valores EC₅₀ (Concentração Efetiva) nos diferentes períodos de avaliação.

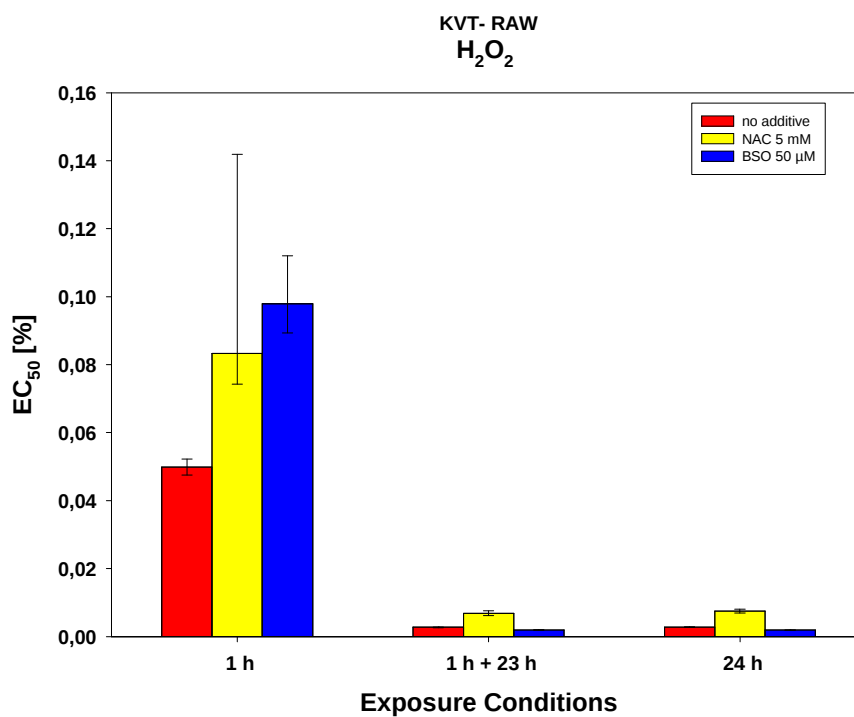


Figura 8 – Gráfico de barras ilustrando o efeito do H₂O₂ 10% na sobrevivência celular em diferentes períodos de avaliação.

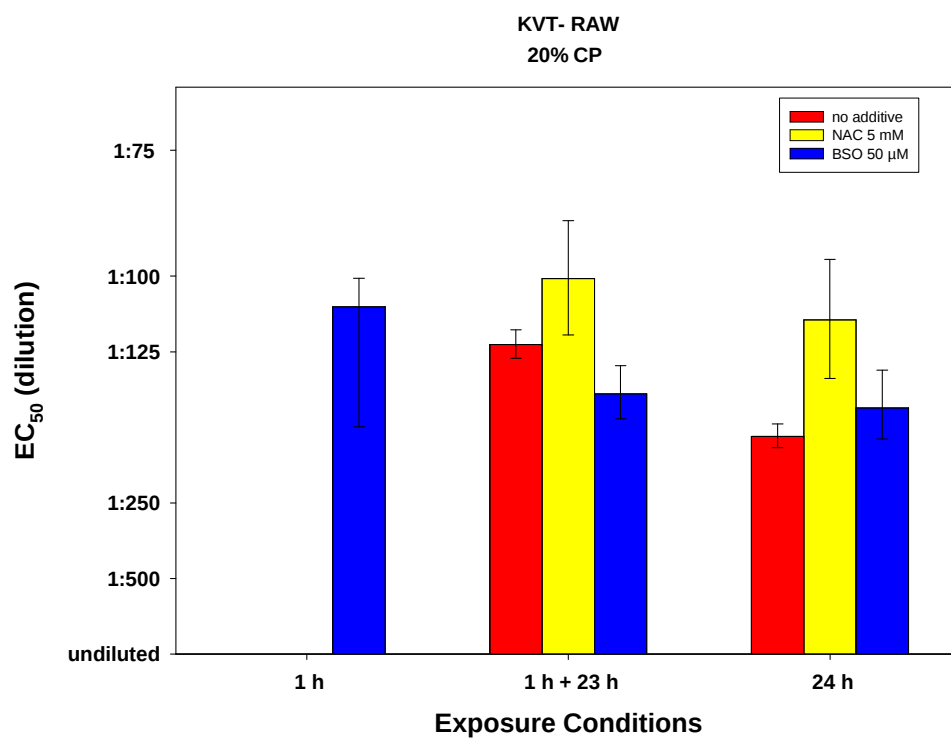


Figura 9 – Gráfico de barras ilustrando o efeito do Peróxido de Carbamida 20% na sobrevivência celular em diferentes períodos de avaliação.

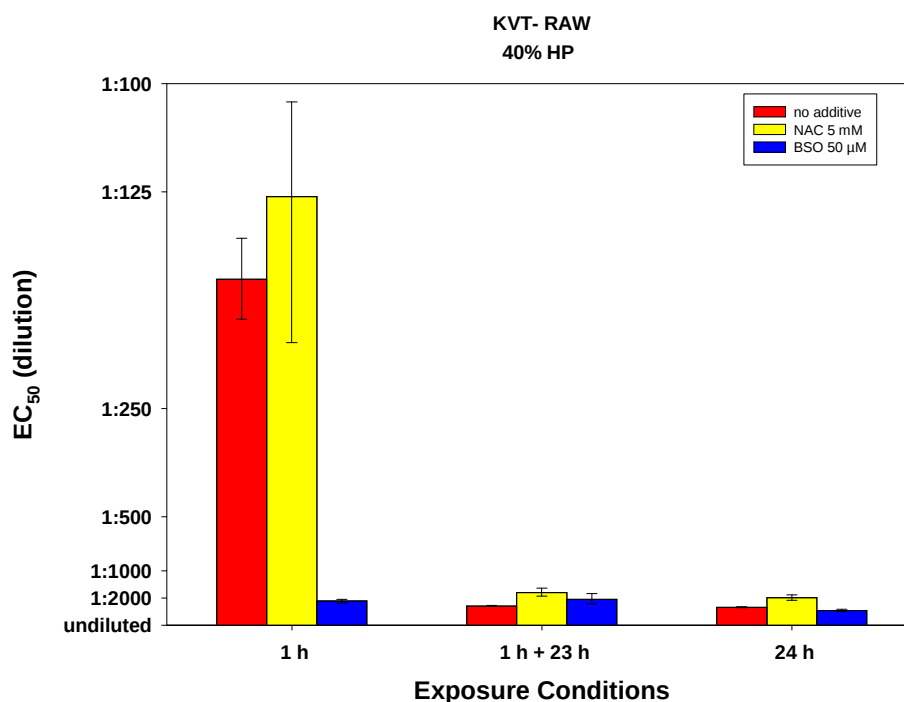


Figura 10 – Gráfico de barras ilustrando o efeito do Peróxido de Hidrogênio 40% na sobrevivência celular em diferentes períodos de avaliação.

A análise estatística foi realizada através do teste de Mann Whitney com nível de significância a 5%. Os resultados mostraram que todas as diluições do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) 10% utilizadas neste estudo, reduziram a taxa de sobrevivência celular significativamente em relação ao grupo controle, em todos os períodos de avaliação ($p=0$), com exceção das concentrações de 0,001% e 0,003% no período de 1 hora e de 0,001%, no período de 1 hora+23 horas que mostraram-se não significante em relação ao grupo controle ($p\geq 0,005$). O peróxido de carbamida 20% reduziu significativamente a proliferação celular em relação ao grupo controle a partir da diluição 1:500 nos períodos de 1 hora ($p= 0,001$ para a diluição 1:500; todas as demais, $p < 0,05$) e 1 hora + 23 horas ($p = 0,002$ para a diluição 1:500; todas as demais, $p < 0,05$) e 1:1000 no período de 24 horas de avaliação ($p= 0,02$ para a diluição 1:1000; todas as demais, $p < 0,05$). Já o peróxido de hidrogênio 40%

reduziu a viabilidade celular significativamente em relação ao grupo controle a partir da diluição 1:4000 no período de 1 hora ($p=0$ para a diluição 1:4000, com exceção das diluições 1:2000 e 1:500, que se mostram não significantes); 1:5000 no período de 1 hora + 23 horas ($p=0$) e para todas as diluições no período de 24 horas ($p=0$) (Tabelas 4, 5 e 6). Verificou-se ainda que a NAC aumentou a sobrevivência celular em todas as diluições e concentrações dos materiais testados, enquanto o BSO diminuiu a sobrevivência celular (ANEXO B).

Tabela 4- Teste de Mann Whitney comparando o Grupo Controle com H_2O_2 10% nos três períodos de avaliação no ensaio KVT

Concentrações do H_2O_2 X Grupo Controle		
1 hora	1 hora + 23 horas	24 horas
0,001% $p=ns$	0,001% $p=ns$	0,001% $p=0$
0,003% $p=ns$	0,002% $p=0$	0,002% $p=0$
0,005% $p=0$	0,003% $p=0$	0,003% $p=0$
0,01% $p=0$	0,004% $p=0$	0,004% $p=0$
0,025% $p=0$	0,005% $p=0$	0,005% $p=0$
0,05% $p=0$	0,01% $p=0$	0,01% $p=0$
0,075% $p=0$	-	-
0,1% $p=0$	-	-

ns: Valor não significante ($p \geq 0,05$)

Tabela 5- Teste de Mann Whitney comparando o Grupo Controle com Peróxido de Carbamida 20% nos três períodos de avaliação no ensaio KVT

Diluições Peróxido de Carbamida 20% X Grupo Controle			
Diluições	1 hora	1 hora + 23 horas	24 horas
1: 10000	p= 0,035	p=ns	p=ns
1: 1000	p=ns	p=ns	p= 0,02
1: 750	p=ns	p=ns	p= 0,001
1:500	p= 0,001	p= 0,002	p=0
1:250	p= 0,009	p=0	p=0
1:100	p=0	p=0	p=0
1:50	p=0	p=0	p=0
1:10	p=0	p=0	p=0

ns: Valor não significante ($p \geq 0,05$)

Tabela 6- Teste de Mann Whitney comparando o Grupo Controle com Peróxido de Hidrogênio 40% nos três períodos de avaliação no ensaio KVT

Diluições Peróxido de Hidrogênio 40% X Grupo Controle			
Diluição	1 hora	1 hora + 23 horas	24 horas
1:10000	p=0	p=ns	p=0
1:7500	p=ns	p=ns	p=0
1:5000	p=ns	p=0	p=0
1:4000	p=0	p=0	p=0
1:3000	p=0	p=0	p=0
1:2000	p=ns	p=0	p=0
1:1000	p= 0,009	p=0	p=0
1:500	p=ns	p=0	p=0
1:100	p=0	p=0	p=0
1:10	p=0	p=0	p=0

ns: Valor não significante ($p \geq 0,05$)

5.3 Mensuração dos níveis de espécies reativas de oxigênio

A geração da fluorescência, indicativa na produção de ROS, foi determinada após exposição aos materiais testados em diferentes períodos de avaliação. As médias das intensidades de fluorescência foram obtidas por histogramas estatísticos utilizando o programa BD FACS Diva, e estas médias foram padronizadas de acordo

com o grupo controle negativo (fator de fluorescência = 1,0). O TEGDMA foi utilizado como controle positivo. As figuras 11, 12, 13 e 14 ilustram o efeito dos agentes clareadores na produção de ROS nos diferentes períodos de avaliação. Verifica-se que a NAC sempre apresentou tendência de diminuir a produção de ROS, enquanto que o BSO apresentou efeito oposto. Nas concentrações mais altas dos agentes clareadores em teste, a alteração dessa tendência principalmente nas condições experimentais onde o BSO foi utilizado como aditivo, deve-se a ausência de células viáveis, e não ao efeito desse aditivo propriamente dito.

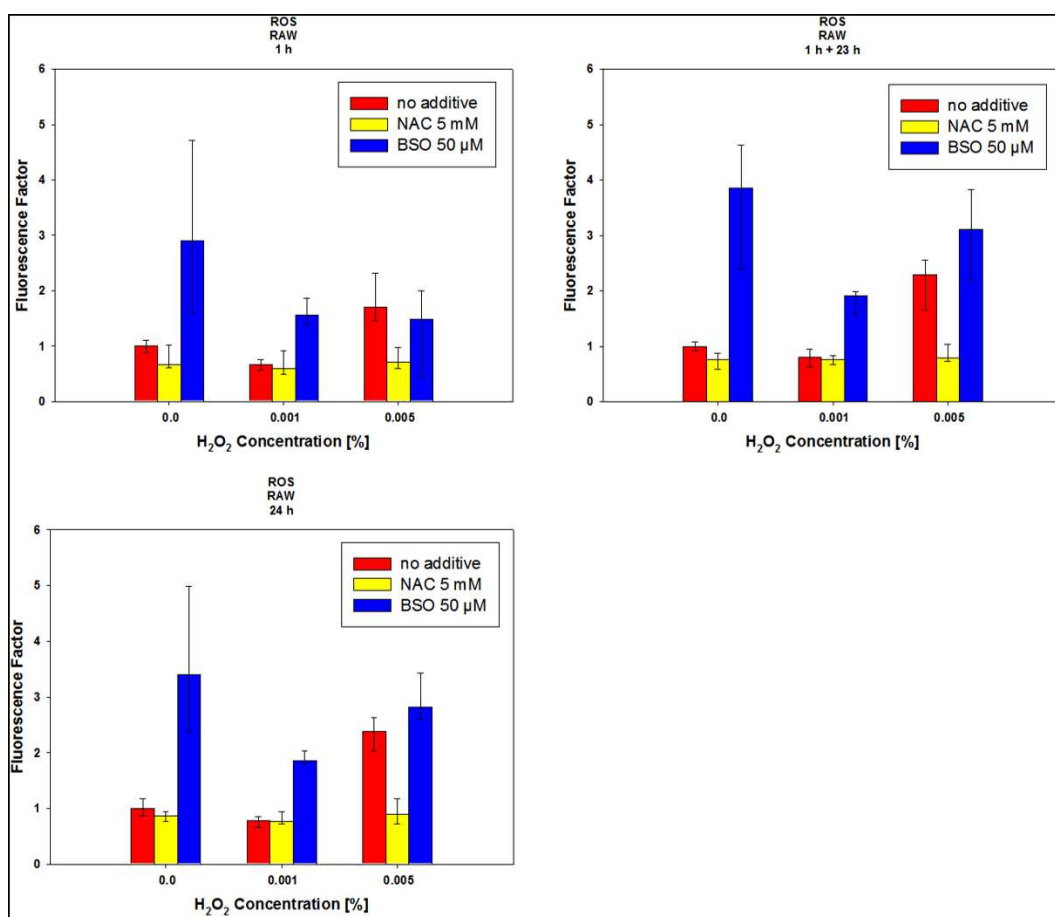


Figura 11 – Gráfico de barras ilustrando o efeito do H₂O₂ 10% na produção de ROS em diferentes períodos de avaliação.

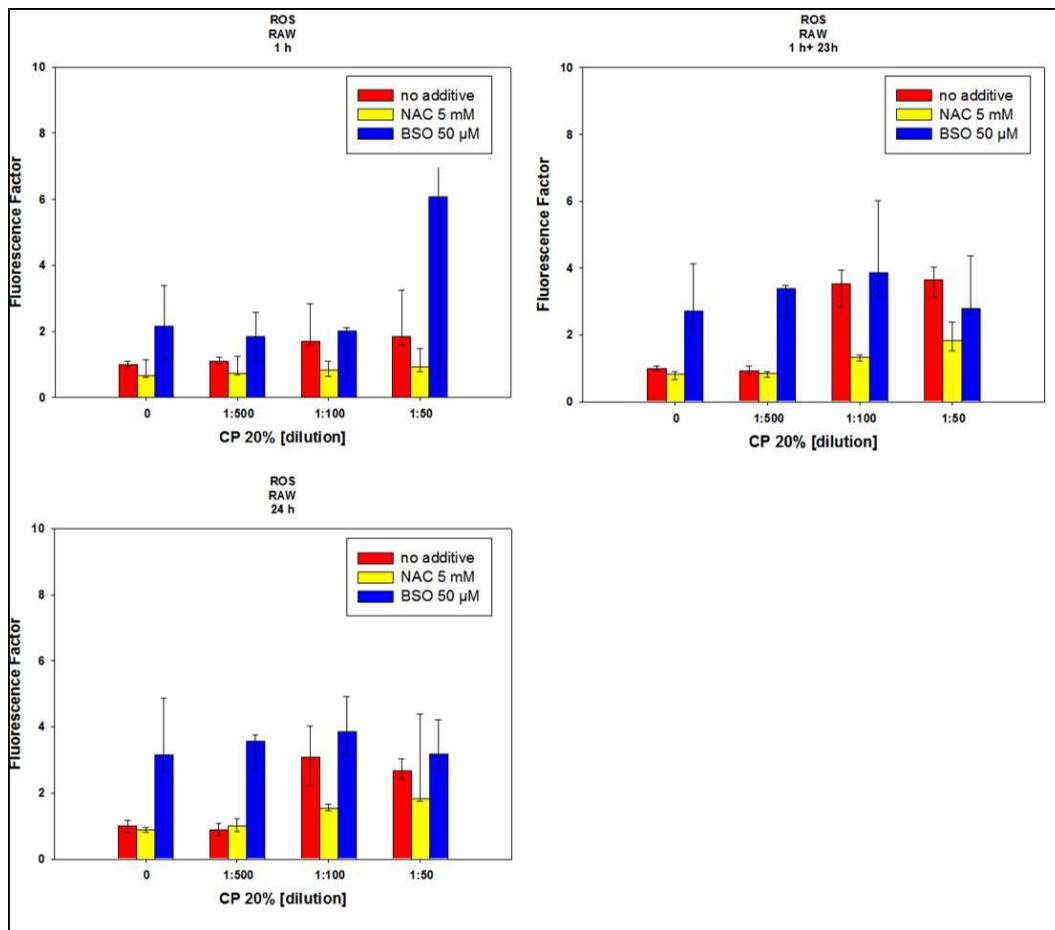


Figura 12 – Gráfico de barras ilustrando o efeito do Peróxido de Carbamida 20% na produção de ROS em diferentes períodos de avaliação.

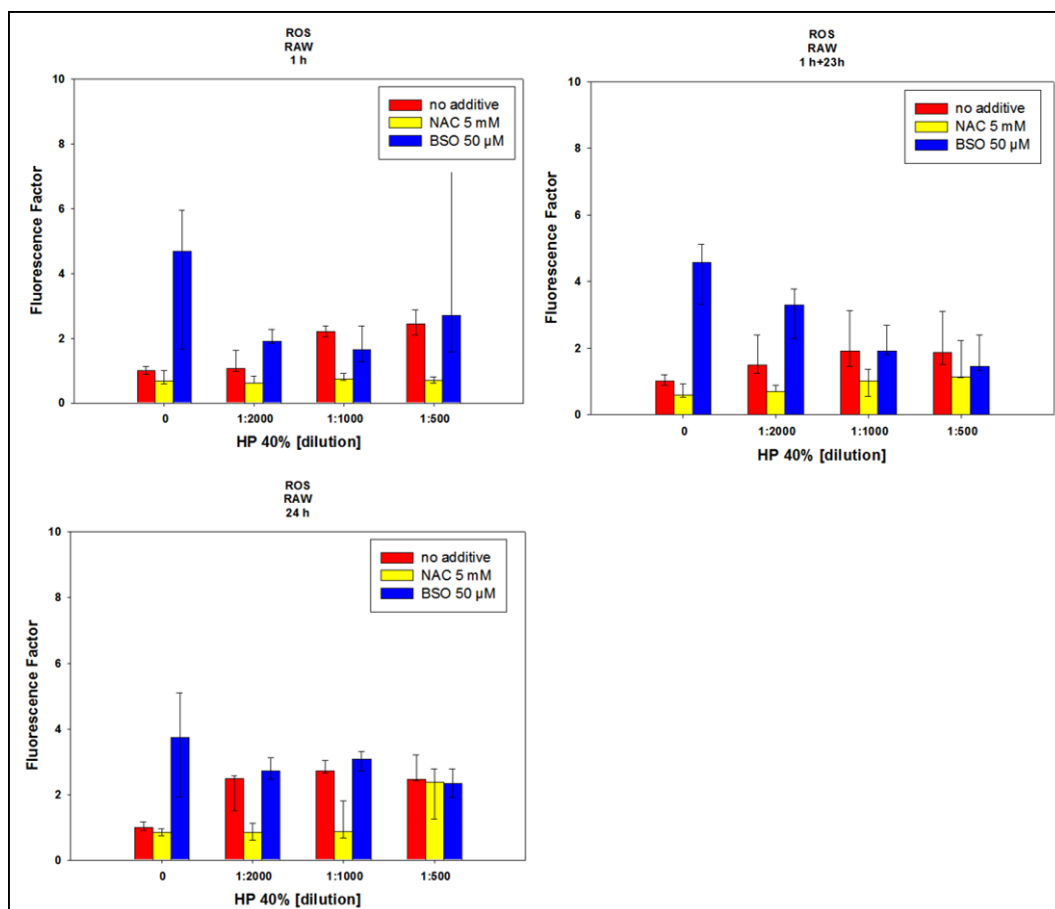


Figura 13 – Gráfico de barras ilustrando o efeito do Peróxido de Hidrogênio 40% na produção de ROS em diferentes períodos de avaliação.

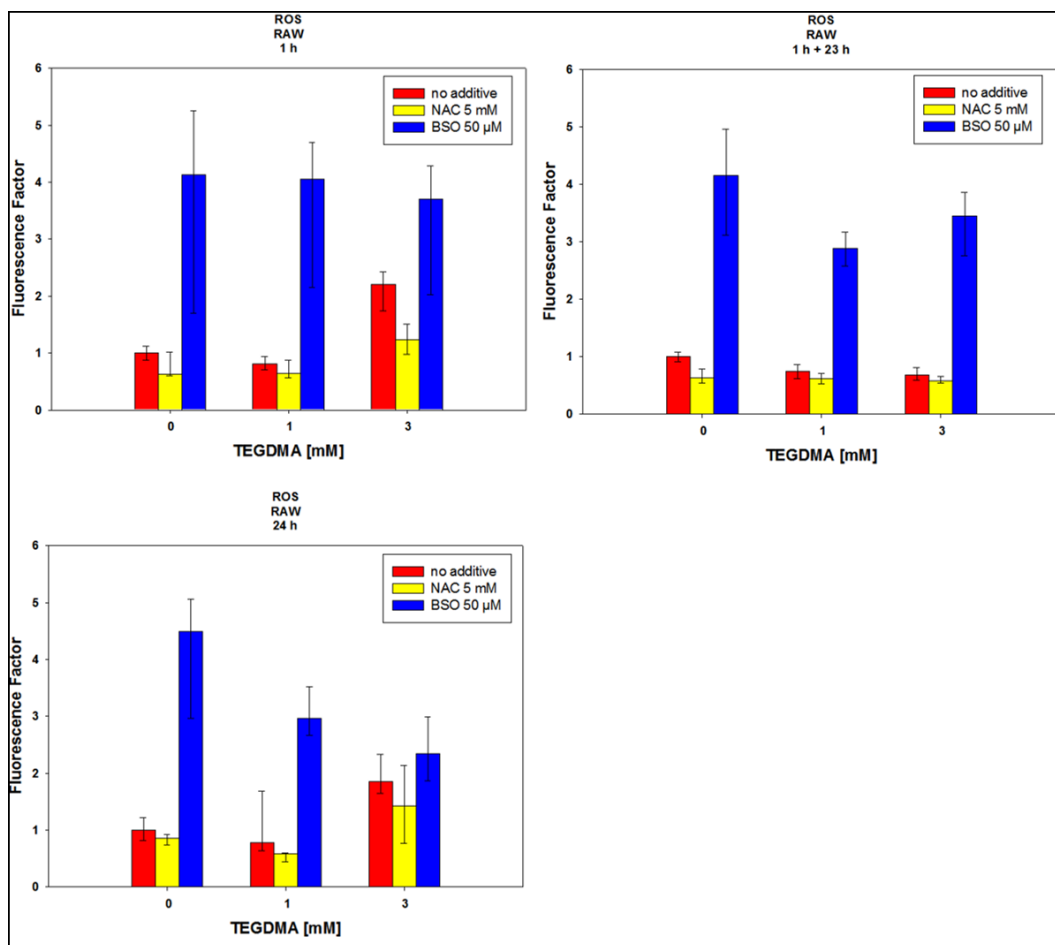


Figura 14 – Gráfico de barras ilustrando o efeito do TEGDMA na produção de ROS em diferentes períodos de avaliação.

A análise estatística foi realizada através do teste de Mann Whitney com nível de significância a 5%. Os resultados mostraram que todas as diluições do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) 10% utilizadas neste estudo, aumentaram significativamente a produção de ROS em relação ao grupo controle, quando este material foi utilizado sem aditivo e aditivado ao BSO em todos os períodos de avaliação ($p=0$). Ao comparar o H_2O_2 associado à NAC em relação ao grupo controle, a produção de ROS foi diminuída, porém não foi estatisticamente significativa ($p \geq 0,05$). Entretanto, ao se comparar o H_2O_2 sem aditivo com H_2O_2 associado à NAC, verificou-se que a NAC diminuiu a produção de ROS, sendo

significante em todos os períodos, na concentração de 0,005%. A produção de ROS pelo peróxido de carbamida 20% no período de 1 hora aumentou significativamente em relação ao grupo controle nas diluições 1:50 e 1:100 sem aditivos ($p=0$). A adição de NAC e BSO não interferiram significativamente na produção de ROS neste mesmo período ($p \geq 0,05$). Já nos períodos de avaliação de 1 hora + 23 horas e 24 horas, o peróxido de carbamida 20% sem aditivo, aumentou a produção de ROS significativamente em relação ao controle apenas nas diluições 1:50 e 1:100 ($p=0$). O peróxido de hidrogênio 40% sem aditivo no período de 1 hora, aumentou a produção de ROS significativamente em relação ao grupo controle apenas nas diluições 1:500 e 1:1000 ($p=0$). Ainda, o peróxido de hidrogênio 40% sem aditivo, nos períodos de avaliação de 1 hora+ 23 horas e 24 horas, aumentou significativamente a produção de ROS em todas as diluições ($p=0$). O BSO mostrou efeito significativo no aumento da produção de ROS, para o peróxido de hidrogênio 40% apenas nas diluições 1:500 e 1:1000 no período de 1 hora+ 23 horas, em relação ao grupo controle ($p=0$).

5.4 Análise da detecção de marcadores de superfície: CD14, CD40 e CD54

A expressão de marcadores de superfície foi detectada por fluorescência. A média da intensidade de fluorescência foi obtida por um histograma estatístico, utilizando o programa BD FACS Diva.

Para cada experimento, a quantidade de expressão de antígenos de superfície de todas as células contadas (células positivas), para cada condição experimental, em foi calculada pela seguinte equação:

**índice de expressão absoluta = % células positivas x intensidade
média de fluorescência**

Um índice de expressão absoluta para cada condição experimental foi calculado e expresso como porcentagem em relação ao índice de expressão absoluto de células do grupo controle (com e sem aditivos), com LPS, também referido como índice de expressão relativa. A mediana dos níveis de antígenos de superfície de expressão foram analisados estatisticamente por meio do teste U de Mann-Whitney para comparações de pares entre os grupos no nível de 0,05 significância.

Em relação à expressão dos marcadores de superfície CD14, CD40 e CD54, pode-se observar que o LPS estimulou a expressão desses marcadores, aumentando significativamente, quando comparado com a ausência do mesmo, em todas as condições experimentais (Figura 15, 16 e 17).

Nas concentrações mais altas dos agentes clareadores em teste, a ausência de expressão destes marcadores, principalmente nas condições experimentais onde o BSO foi utilizado como aditivo, deve-se à ausência de células viáveis, o que impede a marcação fluorescente dos mesmos (Figura 15, 16 e 17).

Ao avaliar o H₂O₂ 10%, com e sem aditivos, após estimulação com LPS, verificou-se que não houve diferenças estatisticamente significante, na comparação da expressão de CD14 frente às diferentes concentrações deste clareador em relação ao respectivo grupo controle ($p \geq 0,05$). O mesmo ocorreu ao avaliar o H₂O₂ 10% sem estimulação com LPS ($p \geq 0,05$). Em relação ao peróxido de carbamida 20%, quando este clareador foi utilizado em associação ao LPS, a expressão de CD14 aumentou significativamente em relação ao respectivo grupo controle, apenas na diluição 1:250 ($p=0,008$), sem aditivo e diminuiu nas diluições, 1:100 ($p=0,016$) e 1:50 ($p=0,016$), também sem aditivo (essa diminuição deve-se ao fato de a maior parte

das células estarem mortas, devido à alta concentração do agente clareador). Ao utilizar o peróxido de hidrogênio 40% nas células expostas ao LPS, verificou-se aumento significativo na expressão de CD14, em relação ao controle, apenas nas diluições 1:4000 ($p=0,010$) e 1:3000 ($p=0,010$) quando o agente clareador foi utilizado sem aditivos.

Em relação a expressão de CD40, a análise estatística mostrou que o H_2O_2 10%, nas células expostas ao LPS, aumentou a expressão deste marcador em relação ao respectivo grupo controle, apenas nas concentrações de 0,002% e 0,003% quando da utilização do clareador sem aditivo e nas concentrações de 0,004% e 0,005%, quando da associação deste com NAC, embora este aumento não tenha sido significativo ($p \geq 0,05$). O uso do peróxido de carbamida 20% sem aditivos e exposto ao LPS aumentou significativamente a expressão de CD40, apenas na diluição 1:250 ($p=0,008$) e diminuiu significativamente essa expressão nas diluições 1:100 ($p=0,016$) e 1:50 ($p=0,016$) em relação ao grupo controle. Essa diminuição ocorreu provavelmente, pela morte celular, uma vez que uma alta concentração desse clareador, torna-se muito citotóxica, fato também observado com o uso do BSO. O peróxido de hidrogênio 40% nas células expostas ao LPS, aumentou significativamente a expressão de CD40, apenas na diluição 1:4000 ($p=0,010$) em relação ao grupo controle, quando o clareador foi utilizado sem aditivos. A diminuição da expressão de CD40 ocorreu nas concentrações mais altas desse clareador, especialmente quando este foi associado ao BSO.

O marcador de superfície celular CD54 foi o que mostrou maior expressão nas células RAW 264.7, frente ao uso de agentes clareadores. Nas células expostas ao LPS, o uso de H_2O_2 10% sem aditivos, aumentou significativamente a expressão de CD54 apenas na concentração de 0,003% ($p=0,029$). Ainda nas células expostas ao LPS, a utilização do aditivo BSO ao H_2O_2 10%, aumentou significativamente a expressão de CD54 no grupo controle e nas concentrações 0,001% e

0,002%, quando comparado ao grupo controle com LPS e sem aditivos ($p=0,029$). A NAC, produziu efeito inverso ao diminuir a expressão de CD54 no grupo controle e nas concentrações 0,001%, 0,002% e 0,003%, quando comparado ao grupo controle com LPS e sem aditivos ($p=0,029$). Quanto ao peróxido de carbamida 20%, sem aditivos e nas células expostas ao LPS, verificou-se aumento significativo na expressão de CD54 nas diluições 1:500 ($p=0,008$) e 1:250 ($p=0,008$). Na associação do peróxido de carbamida 20% à NAC, também verificou-se aumento significativo da expressão de CD54 nas diluições 1:100 ($p=0,016$) e 1:50 ($p=0,016$), em relação aos respectivos grupos controle. O peróxido de hidrogênio 40% aumentou significativamente a expressão de CD54, nas diluições 1:4000, 1:3000 e 1:2000 quando este clareador foi utilizado sem aditivos e na presença de LPS, em relação ao respectivo grupo controle. Entretanto, ao associar o BSO ao peróxido de hidrogênio 40%, verificou-se diminuição da expressão de CD54 nas diluições 1:2000 e 1:1000, quando comparadas ao respectivo grupo controle.

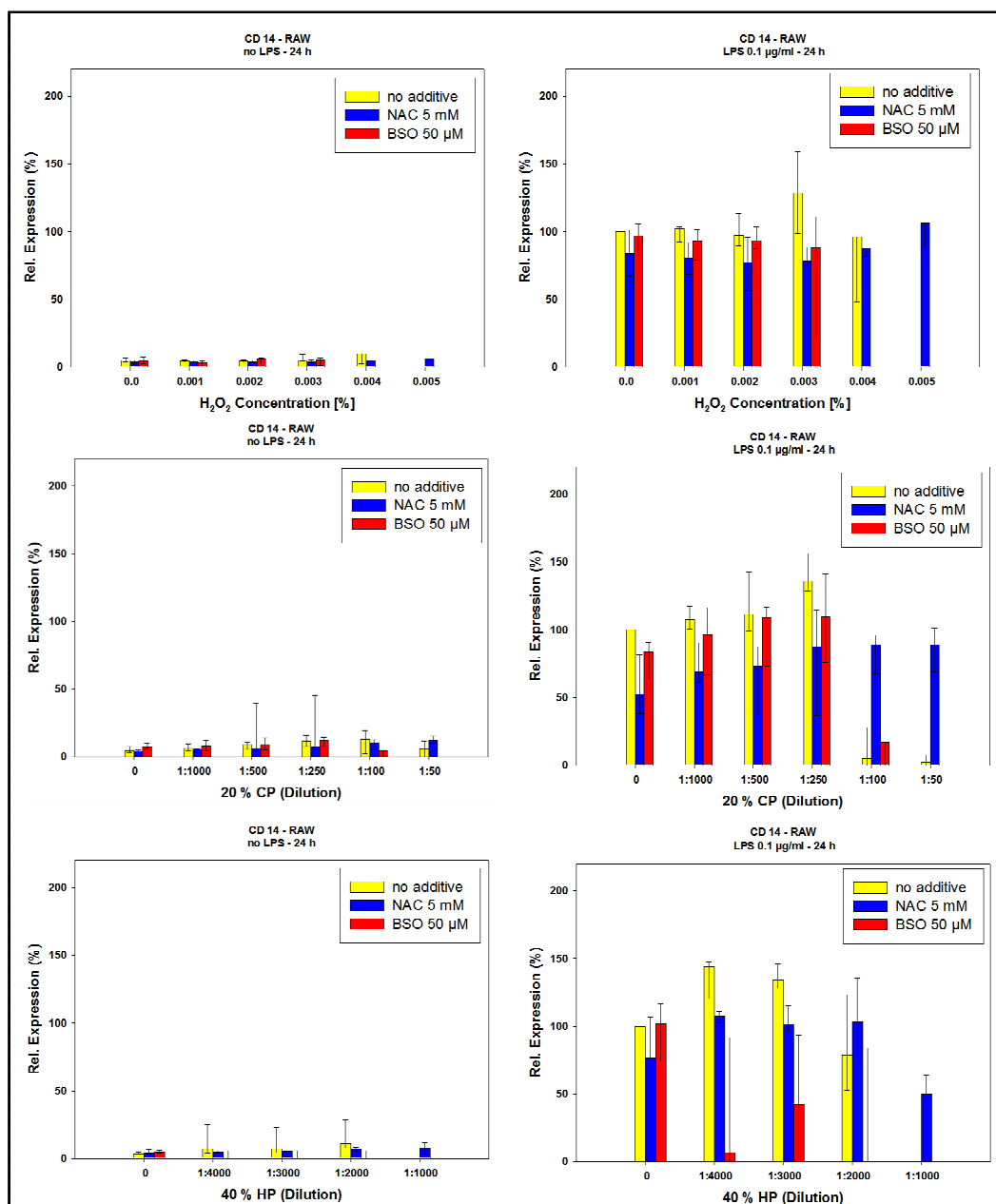


Figura 15 – Gráfico de barras ilustrando a expressão de CD14 frente aos agentes clareadores (H₂O₂ 10%, Peróxido de Carbamida 20% e Peróxido de Hidrogênio 40%) com e sem estimulação por LPS.

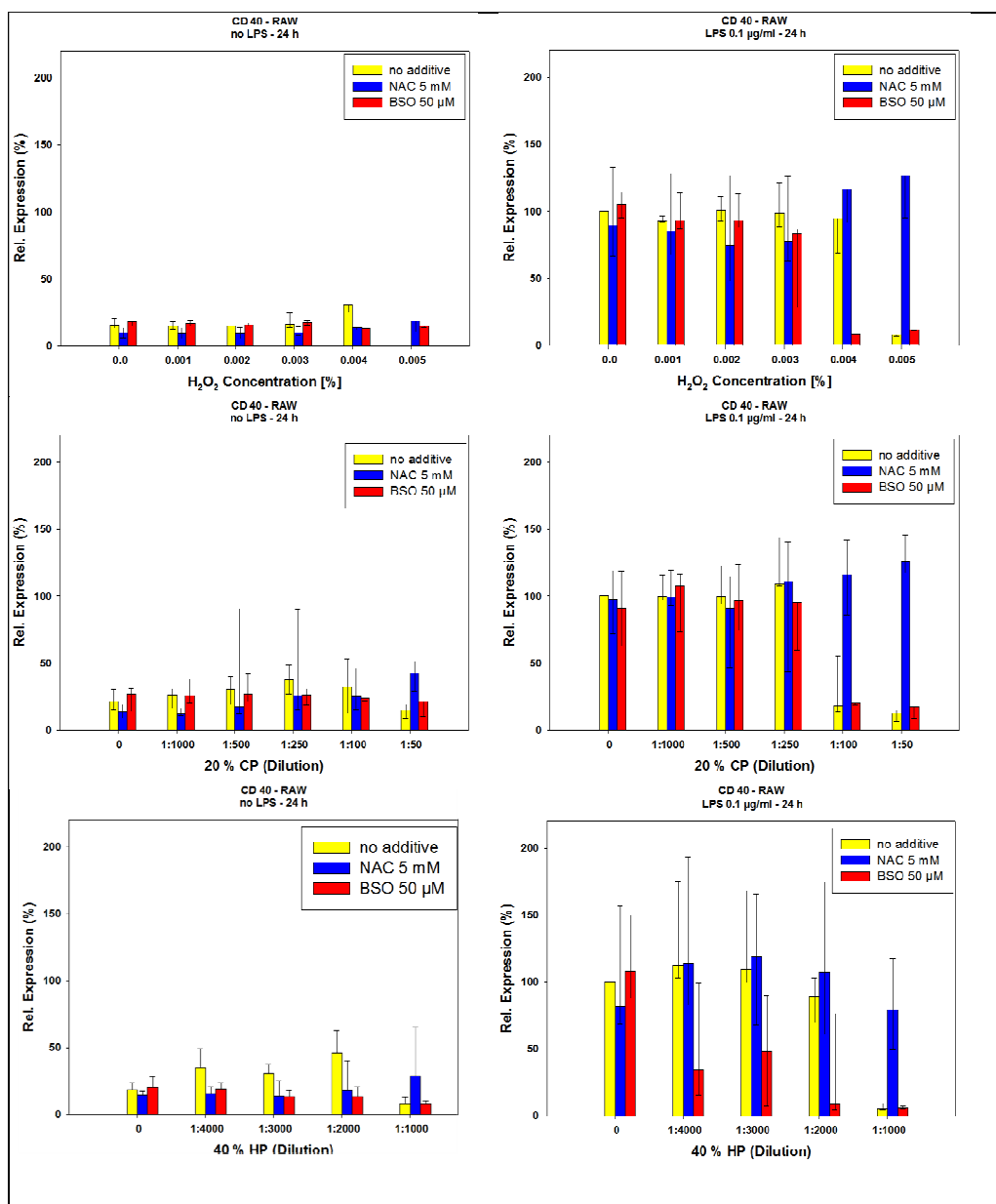


Figura 16 – Gráfico de barras ilustrando a expressão de CD40 frente aos agentes clareadores (H_2O_2 10%, Peróxido de Carbamida 20% e Peróxido de Hidrogênio 40%) com e sem estimulação por LPS.

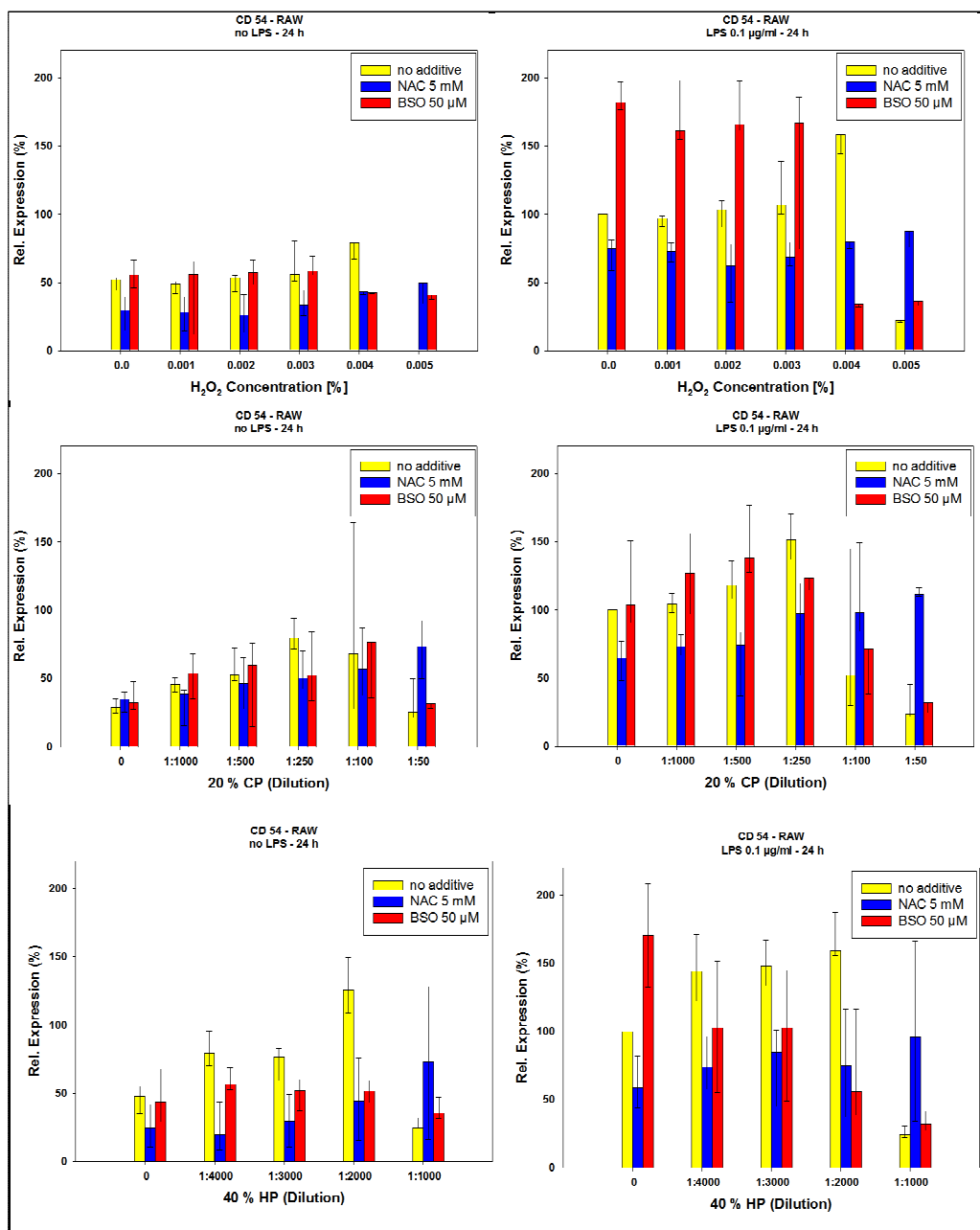


Figura 17 – Gráfico de barras ilustrando a expressão de CD54 frente aos agentes clareadores (H₂O₂ 10%, Peróxido de Carbamida 20% e Peróxido de Hidrogênio 40%) com e sem estimulação por LPS.

5.5 Avaliação da produção de TNF α por ELISA

Os valores de TNF- α (pg/mL) produzidos por macrófagos RAW 264.7, após exposição aos agentes clareadores, com sem ativação por LPS, estão expostos na figura 18.

É possível observar que o LPS estimulou a produção de TNF- α , aumentando significativamente, quando comparado com a ausência do mesmo, em todas as condições experimentais (Figura 18).

Nas concentrações mais altas dos agentes clareadores em teste, a ausência de produção desta citocina inflamatória, principalmente nas condições experimentais onde o BSO foi utilizado como aditivo, deve-se a ausência de células viáveis (Figura 18). Os dados avaliados, embora não visíveis na representação gráfica utilizada, mostraram que nos grupos sem estimulação por LPS, a adição de NAC aumentou a produção de TNF- α em todas as concentrações e diluições dos agentes clareadores, quando comparados aos respectivos grupos sem aditivos e associados ao BSO, embora sem diferença estatisticamente significativa (ANEXO C).

O H₂O₂ 10% aumentou a produção de TNF- α nas concentrações de 0,001%, 0,002% e 0,003% quando este clareador foi utilizado sem aditivos e após a estimulação com LPS, em relação ao respectivo grupo controle. Entretanto, este aumento não foi estatisticamente significativo ($p \geq 0,05$).

O efeito do peróxido de carbamida 20% sobre a produção de TNF- α , ocorreu de forma semelhante ao H₂O₂ 10%, com o aumento da produção desse marcador apenas na diluição 1:1000, 1:500 e 1:250 sem a adição de aditivos e após estimulação com LPS, em relação ao respectivo grupo controle, sendo que este efeito não foi estatisticamente significativo ($p \geq 0,05$).

Nas células estimuladas com LPS, o peróxido de hidrogênio 40% aditivado com NAC, aumentou a produção de TNF- α , nas diluições 1:4000 e 1:3000 e na diluição 1:3000 sem aditivo, em relação aos respectivos grupos controle. Entretanto, estes efeitos não foram estatisticamente significante ($p \geq 0,05$). A adição do BSO a este agente clareador, mostrou-se especialmente tóxica em todas as diluições testadas e impediu a produção de TNF- α pelas células.

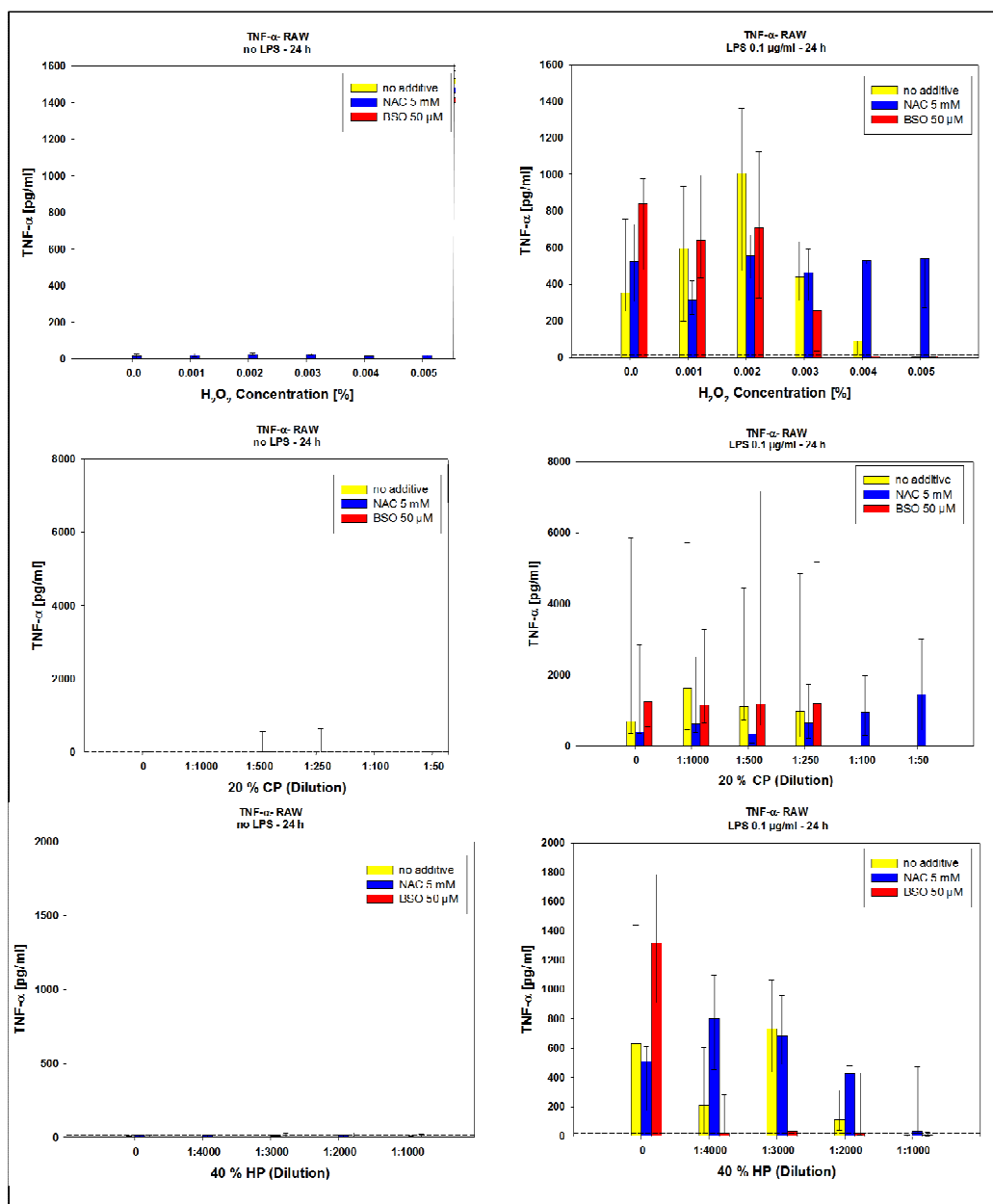


Figura 18 – Gráfico de barras ilustrando a produção de TNF- α após exposição aos agentes clareadores (H₂O₂ 10%, Peróxido de Carbamida 20% e Peróxido de Hidrogênio 40%) com e sem estimulação por LPS.

6 DISCUSSÃO

6.1 Discussão da metodologia

No presente estudo foram realizados cinco tipos de testes para analisar o comportamento biológico de agentes clareadores sobre cultura celulares de macrófagos de linhagem imortalizada (RAW 264.7). A citotoxicidade foi verificada por meio do teste de cristal violeta, avaliando a taxa de sobrevivência celular e pelo teste de MTT, avaliando a viabilidade celular. A produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) foi quantificada por fluorescência em citometria de fluxo. Assim, foi possível analisar a resposta celular quanto aos sinais de transdução relacionados à produção de ROS e consequentemente à sobrevivência e viabilidade celular, após exposição aos agentes clareadores.

Evidências indicam que o processo inflamatório está associado ao stress oxidativo. Os mecanismos descritos por este fenômeno incluem a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) por células inflamatórias recrutadas para tecidos infectados e/ou lesados e pela indução de ROS por fatores ambientais externos (Pazmandi et al., 2012).

Por isso, optou-se por estudar a possível relação dos agentes clareadores com a resposta inflamatória e imunológica, avaliando a presença de TNF α por ELISA e a expressão dos marcadores celulares: CD14, CD40 e CD54 por citometria de fluxo.

Durante o processo inflamatório, uma grande quantidade de sinais modulatórios e processos metabólicos são ativados por

macrófagos. Macrófagos de linhagem imortalizada RAW 264.7 foram as células de escolha para a realização deste estudo, uma vez que foi proposto aliar os efeitos tóxicos de agentes clareadores, correlacionando esses dados com a resposta imune e inflamatória. Essas células também foram a opção de escolha para a realização do estudo de Gasparotto et al. (2013), ao avaliarem o efeito do STP (N-salicyloyltryptamine, agente anti-convulsivo que pode exercer efeitos anti-oxidante em células neurais) em parâmetros de viabilidade, estresse oxidativo e modulação imunológica após exposição dessas ao peróxido de hidrogênio.

Este trabalho utilizou um experimento *in vitro*, sobre um modelo de cultivo celular, que constitui um teste inicial para a avaliação de materiais empregados na Odontologia. Para a realização de testes de cultura de células, podem ser utilizadas células provenientes de linhagens primárias ou imortalizadas (Schmalz, 1994). A cultura primária de células é uma população heterogênea com limitado tempo de vida e com características fenotípicas instáveis que apresenta mudanças na sua atividade funcional quando cultivadas por períodos prolongados (Thonemann, Schmalz, 2000; Kudo et al., 2002; Pi et al., 2007). Consequentemente, é difícil obter resultados reproduzíveis e verificar o mecanismo biológico e regenerativo das células com a utilização dessas células (Thonemann, Schmalz, 2000; Takeuchi et al., 2007).

Além disso, alguns autores relatam que o acesso às células primárias é difícil e restrito devido a sua disponibilidade limitada, falta de padronização e mudanças no padrão de expressão de proteínas após um prolongado subcultivo (Galler et al., 2006; Takeuchi et al., 2007).

Sabe-se que as células primárias em cultura têm uma capacidade limitada de divisão e logo alcançam um estado não proliferativo chamado senescência (Shay et al., 1991; Kudo et al., 2002). Senescência é caracterizada pela reduzida proliferação celular, pelo crescimento do citoplasma e finalmente pela morte celular (Shay et al., 1991). Este estado de senescência limita a investigação das células

derivadas da polpa humana quanto ao metabolismo celular, regulação de genes, mecanismo de formação de dentina e/ou cemento, ou resposta a exposição de materiais (Fujii et al., 2006; Galler et al., 2006).

Em contrapartida, linhagens celulares permanentes ou imortalizadas são estáveis, apresentam características biológicas bem definidas e podem ser obtidas a partir de coleções de cultura celulares (Galler et al., 2006). Células imortalizadas derivadas da polpa humana podem mostrar características fenotípicas do tecido original e produzir proteínas e moléculas específicas, as quais estão envolvidas nos mecanismos moleculares da dentinogênese. Além disso, estas células podem sintetizar uma variedade de moléculas, tais como fatores de crescimento e citocinas, as quais permitem a investigação de possíveis efeitos sobre o metabolismo celular e a interação célula-célula *in vitro* (Galler et al., 2006).

Para os testes de citotoxicidade são encontradas diferentes formas de contato dos agentes clareadores sobre as células. Hanks et al., 1993, Koulaouzidou et al., 1998 e Kinomoto et al., 2001, realizaram diluições do peróxido de hidrogênio, para avaliar a citotoxicidade dos agentes clareadores utilizados. Assim como Ribeiro et al., 2005, que ao avaliar a genotoxicidade de agentes clareadores optaram por diluí-los. Já Aren, em 2003, condicionou o meio de cultura com o agente clareador antes da aplicação sobre as células, assemelhando-se à utilização clínica. Desta forma, para o presente estudo optou-se também pelo condicionamento do meio de cultura. Este método permite que as substâncias liberadas durante a aplicação do agente clareador sejam concentradas no meio de cultivo, sem que ocorra contato direto das células com esses agentes (Freshney, 2000; Cavalcanti et al., 2005). Entretanto, como os agentes clareadores utilizados neste estudo apresentam-se em formas físicas diferentes (sendo o H₂O₂ 10% em forma líquida e o Peróxido de Carbamida 20% e Peróxido de Hidrogênio 40% em forma de gel), optou-se por trabalhar com

porcentagens do H_2O_2 10% e diluições Peróxido de Carbamida 20% e Peróxido de Hidrogênio 40%, o que dificulta a comparação desses grupos entre si. Além disso, o H_2O_2 10% utilizado na forma líquida, corresponde ao peróxido puro e esta concentração foi a concentração máxima possível para a manipulação sem que houvesse a desestabilização do peróxido. Entretanto, o peróxido de hidrogênio 40% e o peróxido de carbamida 20% são produtos comerciais, ou seja, possuem outras substâncias além dos peróxidos, outros aditivos estão presentes em sua formulação, o que não pode garantir a real concentração de peróxido do produto. Sendo assim, o H_2O_2 10% além de ter sido utilizado em porcentagem, correspondeu ao controle positivo do experimento, uma vez que representava a concentração correta de peróxido puro.

O ensaio com o MTT (brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolium) vem sendo utilizado como um teste de citotoxicidade em culturas celulares devido sua rapidez e objetividade. O princípio desse teste baseia-se na capacidade das células viáveis em reduzirem o sal do MTT em seu metabolismo mitocondrial. Esse sal reduzido adquire uma coloração roxa, que pode ser mensurada em espectrofotômetro utilizando-se um leitor de Elisa (Kim et al., 2007). Este ensaio foi utilizado por muitos autores com a finalidade de avaliar a citotoxicidade de diversos materiais na área da odontológica (Lima et al., 2009; Bin et al., 2012; Chen et al., 2013), sendo também o teste de escolha para a realização do presente estudo, por oferecer resultados mais precisos, sendo sensível a pequenas alterações no metabolismo celular.

O teste de cristal violeta é um teste sensível para quantificar o número de células, além de ser capaz de monitorar a proliferação celular. O cristal violeta é um corante básico que promove manchamento das proteínas do núcleo celular, e a densidade óptica do corante pode ser mensurada em um espectrofotômetro (Gillies et al., 1986). Este método tem sido utilizado para avaliar a citotoxicidade de

materiais e medicamentos com a finalidade de determinar taxa de sobrevivência celular (Castro-Garza et al., 2007; Camargo et al., 2009).

A vantagem de utilizar os dois testes (MTT e KVT) para avaliar a citotoxicidade de materiais, é que cada teste oferece informações diferentes em relação às culturas celulares, sendo um complementado pelo outro. O teste de KVT avalia a massa celular remanescente, ou seja, a quantidade de células que permanecem aderidas e são então fixadas nas placas de cultivo celular, não significando que essas células estejam com o seu metabolismo em funcionamento adequado. Já o teste MTT, oferece informações em relação a viabilidade celular, apesar de não fornecer informações em relação ao crescimento e proliferação dessas células. No presente estudo, verificamos tanto a viabilidade quanto a proliferação celular nas culturas de RAW 264.7.

Para o teste de ROS foi utilizada a sonda fluorescente (H₂DCF-DA) a qual é sensível na detecção de peróxido de hidrogênio. Esta sonda possui como vantagem, o fato de poder ser usada como marcador oxidativo tanto no meio intracelular como no meio extracelular. Por ser um grupo diacetato apolar, essa sonda difunde-se facilmente através da membrana celular em diferentes tecidos. Dentro das células, este grupo diacetato pode ser facilmente hidrolisado por enzimas esterases citosólicas, deixando livres as moléculas de DCFH (do 2,7- diclorodihidrofluoresceína). Por ser, agora, polar, essa molécula proporciona um excelente substrato ao peróxido de hidrogênio gerado em excesso, durante o aumento do metabolismo oxidativo. Outra grande vantagem desse método está na sua alta sensibilidade de detecção de ROS, permitindo a análise quantitativa destes na ordem de picomolar (Silveira, 2004). A quantidade de produção de ROS e expressão dos marcadores celulares foram medidas por citometria de fluxo (FACS) que é capaz de mensurar os sinais de fluorescência emitidos pelas células. Estes sinais de fluorescência são capturados pelo feixe de laser argônio

do FACS. Na análise dos resultados dos testes de ROS, as médias geométricas destes sinais de fluorescência obtidas pela análise em FACS foram transformadas em um fator de fluorescência, sendo que quanto maior este fator, maior a produção de ROS pelas células.

A citometria de fluxo é também o teste de escolha para análise de marcadores de superfície celular, sendo amplamente utilizada em diversas pesquisas, a fim de investigar a influência de materiais e produtos na regulação desses marcadores, bem como análise de ciclo celular (D'Antò et al., 2009; Eckhardt et al., 2009; Kuan et al., 2012). Foi portanto o método de escolha para verificar os efeitos dos agentes clareadores no CD14, CD40 e CD54.

Para quantificar citocinas inflamatórias, o método mais utilizado é o ensaio imunoenzimático (ELISA), sua metodologia é consagrada, garantindo resultados precisos e confiáveis (Eckhardt et al., 2009; Krifka et al., 2010). Para avaliar a produção de TNF- α , optou-se neste estudo pelo uso do teste ELISA.

6.2 Discussão dos Resultados

Ao analisar os resultados dos testes de citotoxicidade (MTT e KVT), pode-se observar que a agressão provocada pelos agentes clareadores no período de 1 hora + 23 horas é praticamente igual ao período de 24 horas. Isso indica que após 1 hora de contato desses clareadores com as células, a ação tóxica do clareador continua agindo nas células, uma vez que, mesmo com a retirada do contato e inserção de meio de cultivo fresco, as células não são capazes de se recuperar, caracterizando assim, efeito irreversível. Pode se notar também, principalmente no teste de viabilidade celular (MTT), o efeito protetor da

NAC, necessitando de concentrações mais elevadas dos clareadores, para a obtenção de 50% de viabilidade celular.

A NAC é um pró-fármaco de cisteína e glutathione (GSH) (Weiss, Landawer, 2000). Vários efeitos são atribuídos à NAC, como potencial protetor contra citotoxicidade e genotoxicidade (Reliene et al., 2009). Além disso, a NAC ao bloquear a geração de ROS evita a apoptose (Han et al., 2013). Desta forma, verificou-se que a NAC agiu positivamente, protegendo as células contra os efeitos tóxicos dos clareadores, aumentando a viabilidade e a sobrevivência celular nos grupos tratados com NAC.

Ao comparar a viabilidade com a sobrevivência celular frente aos clareadores, pode-se observar que houve diferenças, principalmente no período de 1 hora de exposição dos agentes clareadores com as células. Neste período inicial, o teste de MTT mostrou que os clareadores afetaram o metabolismo das células, diminuindo sua viabilidade, entretanto, ao realizar o teste KVT, verificou-se que essa ação ainda não havia sido capaz de provocar morte celular, uma vez que estas células não viáveis, foram coradas pelo KVT no fundo do poço, indicando uma aparente normalidade na taxa de sobrevivência celular. Esse efeito pode ser bem observado, ao se comparar a Figura 6 (ilustrando a taxa de viabilidade celular após exposição ao peróxido de carbamida 20%) com a Figura 9 (ilustrando a taxa de sobrevivência celular após exposição ao peróxido de carbamida 20%). Outros estudos na literatura utilizaram estes testes como complementares para avaliação de citotoxicidade (Costa et al., 2007; Chen et al., 2013), que verificaram que os testes de MTT e KVT apresentaram resultados bem semelhantes.

Utilizando uma câmara pulpar *in vitro*, Lima et al. (2013) avaliaram a toxicidade do peróxido de Carbamida 10% e do peróxido de Hidrogênio 35% sobre células MDPC23 através do teste de MTT. Esses autores concluíram que após 45 minutos de contato do peróxido de hidrogênio 35% com os discos de esmalte/dentina, o metabolismo celular

foi reduzido e tornou-se de 45%, enquanto que o Peróxido de Carbamida 10% após 5 dias de aplicação reduziu o metabolismo celular em torno de 75%. Embora o presente estudo ter sido realizado com metodologia diferente, também foi verificado uma redução maior da viabilidade celular do peróxido de hidrogênio, em relação ao peróxido de carbamida. Estes resultados também estão de acordo com o estudo de Fernandes et al., 2013, que também utilizando a mesma metodologia de condicionamento do meio de cultura, verificaram que após 24 e 48 horas de contato dos agentes clareadores com as células, o peróxido de hidrogênio 40% causou maior redução do metabolismo celular, em relação ao peróxido de carbamida 20%, nos dois períodos de avaliação, sendo ambos, citotóxicos em relação ao grupo controle.

Confirmando os efeitos citotóxicos dos clareadores, Coldebella et al. (2013), ao avaliarem a toxicidade do peróxido de hidrogênio 35%, através da utilização de uma câmara pulpar artificial, concluíram que após 75 minutos de exposição do gel clareador com e sem fotoativação, reduziu a atividade da succinato desidrogenase (SDH), através do teste de MTT, e 61,83% e 62,09% respectivamente.

A produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (ROS) por células na presença de materiais dentários é um indicativo do potencial oxidativo destes materiais (Spagnuolo et al., 2006).

Os organismos aeróbicos produzem e degradam ROS, originando tanto concentrações fisiológicas, como quantidades excessivas que, ao superarem as defesas antioxidantes naturais dão origem a um estado denominado estresse oxidativo (Nordberg, Arner, 2001). Uma produção excessiva de ROS tem sido relatada em processos inflamatórios ou na defesa contra infecções (Baumgardner, Sulfaro, 2001).

A alta quantidade de ROS pode causar quebra em múltiplos sítios celulares, resultando em peroxidação lipídica, oxidação protéica e danos ao ácido nucléico. A quebra destas macromoléculas por

meio de reações de radicais livres dentro das células pode dificultar a função celular ou conduzir a morte celular precoce (Baumgardner, Sulfaro, 2001). Portanto, devido sua elevada reatividade, ROS podem ser considerados como potencialmente tóxicos, mutagênicos e carcinogênicos (Nordberg, Arner, 2001).

Sendo o próprio H_2O_2 a base da composição de agentes clareadores e sendo este uma espécie reativa de oxigênio, já era esperada uma alta produção do ROS nas células expostas aos clareadores no presente estudo. O TEGDMA foi utilizado como controle positivos para o teste de ROS, uma vez que seu efeito na produção de ROS e na depleção de sistemas anti-oxidativos como o GSH é bem estabelecido (Schweikl et al., 2006; Schmalz et al., 2011), causando danos no DNA celular e eventualmente, apoptose (Schmalz et al., 2011). Todos os peróxidos utilizados no presente estudo, apresentaram níveis similares ao TEGDMA na geração de ROS, sendo que a concentração desses peróxidos foi proporcional à geração dessas espécies reativas de oxigênio. A queda na geração de ROS, em concentrações mais elevadas dos agentes clareadores, principalmente nos períodos de 1 hora + 23 horas e 24 horas pode ser explicada pela pequena quantidade de células presentes, uma vez que a maior parte destas encontravam-se mortas devido à toxicidade dos clareadores. Verificou-se ainda um efeito protetor da NAC, como um antioxidante, tendo a tendência a diminuir a geração de ROS (Hall et al., 1988; Flora et al., 2001; Han et al., 2013). Esta ação ocorre diretamente (Reliene, 2009) ou pelo GSH através da desacetilação da cisteína (Aruoma et al., 1989; Sjodin et al., 1989; Raftos et al., 2007). Ainda, NAC pode agir modulando a atividade das enzimas redox sensíveis ou intensificando a expressão de manganês superóxido desmutase, uma enzima crítica de proteção contra ROS (Das et al., 1995; Zafarullah et al., 2003), confirmando os efeitos protetores deste fármaco, como verificado no presente estudo.

Vários estudos mostraram que dentre os diversos efeitos do NAC encontra-se sua atividade direta na eliminação de ROS. Ainda, os resultados do presente estudo estão de acordo com os de Lee et al. (2013), que avaliaram o efeito protetor da buteína (um antioxidante natural) frente ao H_2O_2 . Esses autores concluíram que o peróxido de hidrogênio em uma concentração de 1 mM foi capaz de diminuir significativamente a viabilidade celular (cerca de 30%) após 12 horas de contato com células pulpares humanas transfectadas (HDP). Os resultados mostraram ainda que essa mesma concentração de H_2O_2 aumentou significativamente a geração de ROS (mais de 100% em relação ao controle negativo). Entretanto, a utilização da butationa, reduziu os efeitos tóxicos deste peróxido, aumentando a viabilidade celular e diminuindo a geração de ROS.

Sato et al. (2013) ao avaliarem os efeitos tóxicos do peróxido de hidrogênio 35%, concluíram que além de danos na estrutura dental, este clareador aumentou significativamente a produção de ROS nas células dos tecidos pulpares de dentes que sofreram clareamento, em relação ao grupo controle. Foi verificado também um aumento de enzimas como MMPs (metaloproteinases de matriz) e catepsinaB, envolvidas no processo de degradação de proteínas, quando da exposição ao peróxido de hidrogênio 35%.

No processo inflamatório, o LPS estimula a produção de vários mediadores inflamatórios endógenos e modula a resposta imune, bem como as funções orgânicas (Jung et al., 2013). Dentre essas moléculas inflamatórias, as citocinas tais como $TNF\alpha$ e IL-6, são produzidas (Aono et al., 1997). O $TNF\alpha$ liberado por monócitos e macrófagos em resposta a vários estímulos e atua como um dos principais mediadores dos efeitos deletérios do LPS (Riches et al., 1996). Verificou-se no presente estudo que o uso dos clareadores pouco interferiu na produção de $TNF\alpha$, entretanto, ao associar o LPS, houve um aumento significativo desta citocina, confirmando os estudos da área

médica que mostram a interferência do LPS na produção de TNF α (Eckhardt et al., 2009; Kuan et al., 2012).

Os macrófagos constituem a principal população celular derivada da medula óssea que possuem a função de apresentar os antígenos para ativar linfócitos T (Guindi et al., 2012). Além disso, os macrófagos constituem a primeira linha de defesa contra patógenos (Hu et al., 2013). Durante a apresentação de antígenos, o nível de expressão de moléculas de superfície pode ser elevado para aumentar a ativação de linfócitos T (Hu et al., 2013). Assim, ao colocarmos estes macrófagos em contato com substâncias tóxicas, esperava-se o aumento da expressão de marcadores de superfície. Entretanto, não verificou-se o aumento destes marcadores, quando colocou-se os macrófagos em contato com os agentes clareadores. Provavelmente, o modelo experimental utilizado seja simples, e para que os macrófagos expressem essas moléculas frente a esses antígenos, exista a necessidade de um ambiente mais complexo, o que não permite afirmar que *in vivo*, a expressão de marcadores celulares e citocinas inflamatórias não possa estar alterada, frente ao uso de clareadores. Além disso, verificou-se que o LPS estimulou a expressão dos marcadores de superfície CD14, CD40 e CD54, significativamente.

7 CONCLUSÃO

De acordo com a metodologia empregada pode-se concluir que:

- Quanto à viabilidade e sobrevivência celular: todos os peróxidos mostraram-se citotóxicos e a citotoxicidade foi proporcional à concentração dos peróxidos. Verificou-se ainda que as células não se recuperam dos efeitos citotóxicos, após uma hora de contato;

- Quanto à produção de ROS: verificou-se que todos os peróxidos estimularam uma alta produção de ROS, mesmo quando estes clareadores encontravam-se mais diluídos. Verificou-se ainda que a NAC sempre apresentou a tendência de diminuir a produção de ROS, enquanto o BSO apresentou efeito oposto;

- Quanto à expressão dos marcadores celulares: verificou-se que a estimulação prévia com LPS aumentou a expressão de todos os marcadores; sendo que o CD54 foi o que causou maior expressão, seguido pelo CD40 e CD14. Verificou-se ainda que o tipo de peróxido pouco interferiu na expressão destes marcadores;

- Quanto à produção de TNF α : verificou-se que o LPS induziu uma maior produção de TNF α pelas células. Os peróxidos apresentaram a tendência de aumentar a produção de TNF α , com exceção das concentrações mais altas, onde as células estavam mortas.

8 REFERÊNCIAS*

Ahmad I. Risk management in clinical practice. Part 5. Ethical considerations for dental enhancement procedures. *Br Dent J.* 2010 Sep 11;209(5):207-14.

Anderson DG, Chiego DJ Jr, Glickman GN, McCauley LK. A clinical assessment of the effects of 10% carbamide peroxide gel on human pulp tissue. *J Endod.* 1999;25(4):247-50.

Aono K, Isobe K, Kiuchi K, Fan ZH, Ito M, Takeuchi A, et al. In vitro and in vivo expression of inducible nitric oxide synthase during experimental endotoxemia: involvement of other cytokines. *J Cell Biochem.* 1997;65:349-58.

Aren G. In vitro effects of bleaching agents on FM3A cell line. *Quintessence Int.* 2003;34(5):361-5.

Aruoma OI, Halliwell B, Hoey BM, Butler J. The antioxidant action of N-acetylcysteine: its reaction with hydrogen peroxide, hydroxyl radical, super-oxide, and hypochlorous acid, *Free Radic. Biol. Med.* 1989;6(6) 593-7.

Arwill T, Myrberg N, Soremark R. Penetration of radioactive isotopes through enamel and dentin. II. Transfer of Na in fresh and chemically treated dental tissues. *Odontol Revy.* 1969;20(1):47-54.

Auschill TM, Hellwig E, Schmidale S, Scullan A, Arweiler NB. Efficacy, side-effects and patients' acceptance of different bleaching techniques (OTC, in-office, at-home). *Oper Dent.* 2005;30(2):156-63.

Azevedo CL, Marques MM, Bombana AC. Cytotoxic effects of cyanoacrylates use as retrograde filling material: an in vitro analysis. *Pesq Odontol Bras.* 2003;17(2):113-8.

* Baseado em: International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical journals: Sample References [homepage na Internet]. Bethesda: US NLM; c2003 [disponibilidade em 2008 ago; citado em 25 ago.] Disponível em: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

Baumgardner KR, Sulfaro MA. The anti-inflammatory effects of human recombinant copper-zinc superoxide dismutase on pulp inflammation. *J Endod.* 2001 Mar;27(3):190-5.

Benetti AR, Valera MC, Mancini MN, Miranda CB, Balducci I. *In vitro* penetration of bleaching agents into the pulp chamber. *Int Endod J.* 2004;37(2):120-4.

Beutler B. Innate immunity: an overview. *Mol Immunol.* 2004 Feb;40(12):845-59.

Bin CV, Valera MC, Camargo SE, Rabelo SB, Silva GO, Balducci I, et al. Cytotoxicity and genotoxicity of root canal sealers based on mineral trioxide aggregate. *J Endod.* 2012 Apr;38(4):495-500.

Bowles WH, Ugwuneri Z. Pulp chamber penetration by hydrogen peroxide following vital bleaching procedures. *J Endod.* 1987;13(8): 375-7.

Bowles WH, Thompson HR. Vital bleaching: the effects of heat and hydrogen peroxide on pulpal enzymes. *J Endod.* 1986;12(3):108-12.

Braun A, Jepsen S, Krause F. Spectrophotometric and visual evaluation of vital tooth bleaching employing different carbamide peroxide concentrations. *Dent Mater.* 2007 Feb;23(2):165-9.

Bruzell EM, Johnsen B, Aalerud TN, Dahl JE, Christensen T. In vitro efficacy and risk for adverse effects of light-assisted tooth bleaching. *Photochem Photobiol Sci.* 2009 Mar;8(3):377-85.

Camargo SE, Camargo CH, Hiller KA, Rode SM, Schweikl H, Schmalz G. Cytotoxicity and genotoxicity of pulp capping materials in two cell lines. *Int Endod J.* 2009 Mar;42(3):227-37.

Camargo SE, Valera MC, Camargo CH, Gasparoto Mancini MN, Menezes MM. Penetration of 38% hydrogen peroxide into the pulp chamber in bovine and human teeth submitted to office bleach technique. *J Endod.* 2007;33(9):1074-7.

Cavalcanti BN, Rode SM, Marques MM. Cytotoxicity of substances leached or dissolved from pulp capping materials. *Int Endod J.* 2005 Aug;38(8):505-9.

Castro-Garza J, Barrios-García HB, Cruz-Vega DE, Said-Fernández S, Carranza-Rosales P, Molina-Torres CA, et al. Use of a colorimetric assay to measure differences in cytotoxicity of *Mycobacterium tuberculosis* strains. *J Med Microbiol.* 2007 Jun;56(Pt 6):733-7.

Chen YZ, Lü XY, Liu GD. A novel root-end filling material based on hydroxyapatite, tetracalcium phosphate and polyacrylic acid. *Int Endod J*. 2013 Jun;46(6):556-64. doi: 10.1111/iej.12028.

Cohen SC, Chase C. Human pulpal response to bleaching procedures on vital teeth. *J Endod*. 1979;5(5):134-8.

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

Cooper JS, Bokmeyer TJ, Bowles WH. Penetration of the pulp chamber by carbamide peroxide bleaching agents. *J Endod*. 1992;18(7):315-7.

Costa CAS. Teste de citotoxicidade em cultura de células. In: Estrela C. *Metodologia científica: ensino e pesquisa em odontologia*. São Paulo: Artes Médicas; 2001. p.146-60.

Costa MT, Lenza MA, Gosch CS, Costa I, Ribeiro-Dias F. .In vitro evaluation of corrosion and cytotoxicity of orthodontic brackets. *J Dent Res*. 2007 May;86(5):441-5.

Dahl JE, Becher R. Acute toxicity of carbamide peroxide and a commercially available tooth-bleaching agent in rats. *J Dent Res*. 1995;74(2):710-4

Dahl JE, Pallesen U. Tooth bleaching--a critical review of the biological aspects. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2003;14(4):292-304.

Dantas CM, Vivan CL, Ferreira LS, Freitas PM, Marques MM. In vitro effect of low intensity laser on the cytotoxicity produced by substances released by bleaching gel. *Braz Oral Res*. 2010 Oct-Dec;24(4):460-6.

Das KC, Lewis-Molock Y, White CW, Activation of NF-kappa B and elevation of MnSOD gene expression by thiol reducing agents in lung adenocarcinoma (A549) cells. *Am J Physiol*. 1995 Nov;269(5 Pt 1):L588-602.

D'Antò V, Eckhardt A, Hiller KA, Spagnuolo G, Valletta R, Ambrosio L, et al. Biomaterials. The influence of Ni(II) on surface antigen expression in murine macrophages. 2009 Mar;30(8):1492-501.

Deliperi S, Bardwell DN, Papathanasiou A. Clinical evaluation of a combined in-office and take-home bleaching system. *JADA*. 2004; 135(5):628-34.

Demirci M, Hiller K-A, Bosl C, Galler K, Schmalz G, Schweikl H. The induction of oxidative stress, cytotoxicity and genotoxicity by dental adhesives. *Dent Mat.* 2008;24(3):362-71.

Deng G, Lin H, Seidman A, Fornier M, D'Andrea G, Wesa K, et al. A phase I/II trial of a polysaccharide extract from *Grifola frondosa* (Maitake mushroom) in breast cancer patients: immunological effects. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2009 Sep;135(9):1215-21.

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

Dostalova T, Jelinkova H, Housova D, Sulc J, Nemec M, Miyagi M, et al. Diode laser-activated bleaching. *Braz Dent J.* 2004;15 (Sp iss):S1 3-8.

Eckhardt A, Harorli T, Limtanyakul J, Hiller KA, Bosl C, Bolay C, et al. Inhibition of cytokine and surface antigen expression in LPS-stimulated murine macrophages by triethylene glycol dimethacrylate. *Biomaterials.* 2009 Mar;30(9):1665-74.

Federation Dentaire International. Recommended standard for biological evaluation of dental materials. *Int Dent J.* 1980;30(2):140-88.

Feinman RA, Goldstein RE, Garber DA. Bleaching teeth. Chicago: Quintessence Books; 1987.

Fernandes AM, Marques MM, Camargo SEA, Cardoso PE, Camargo CHR, Valera MC. Cytotoxicity of non-vital dental bleaching agents in human gingival fibroblasts. *Braz Den Sci.* 2013;16(1):59-65.

Flora S, Izzotti A, D'Agostini F, Balansky RM. Mechanisms of N-acetylcysteine in the prevention of DNA damage and cancer, with special reference to smoking-related end-points, Carcinogenesis. 2001;22:999–1013.

Floyd RA. The effect of peroxides and free radicals on body tissues. *J Am Dent Assoc.* 1997;128 (suppl):S37- 40.

Freshney RI. Culture of Animal Cell: a manual of basic technique. 4. ed. Indianapolis: Wiley Liss; 2000.

Fugaro JO, Nordahl I, Fugaro OJ, Matis BA, Mjör IA. Pulp reaction to vital bleaching. *Oper Dent.* 2004;29(4):363-8.

Fujii S, Maeda H, Wada N, Kano Y, Akamine A. Establishing and characterizing human periodontal ligament fibroblasts immortalized by SV40T-antigen and hTERT gene transfer. *Cell Tissue Res.* 2006;324:117–25.

Galler KM, Schweikl H, Thonemann B, D'Souza RN, Schmalz G. Human pulp-derived cells immortalized with Simian Virus 40 T-antigen. *Eur J Oral Sci.* 2006;114:138–46.

Galy AH, Spits H. CD40 is functionally expressed on human thymic epithelial cells. *J Immunol.* 1992;149:775-82.

Gasparotto J, de Bittencourt Pasquali MA, Somensi N, Vasques LM, Moreira JC, de Almeida RN, et al. Effect of N-salicyloyltryptamine (STP), a novel tryptamine analogue, on parameters of cell viability, oxidative stress, and immunomodulation in RAW 264.7 macrophages. *Cell Biol Toxicol.* 2013 Jun;29(3):175-87.

Gerlack RW, Sagel PA, Barker ML, Karpinia KA, Magnusson I. Placebo-controlled clinical trial evaluating a 10% hydrogen peroxide whitening strip. *J Clin Dent.* 2004;15(4):118-22.

Gillies RJ, Didier N, Denton M. Determination of cell number in monolayer cultures. *Anal Biochem.* 1986 Nov 15;159(1):109-13.

Gökay O, Mujdeci A, Algin E. In vitro peroxide penetration into the pulp chamber from newer bleaching products. *Int Endod J.* 2005; 38(8):516–20.

Gökay O, Müjdeci A, Algin E. Peroxide penetration into the pulp from whitening strips. *J Endod.* 2004;30(12):887-9.

Gökay O, Yilmaz F, Akin S, Tunçbilek M, Ertan R. Penetration of the pulp chamber by bleaching agents in teeth restored with various restorative materials. *J Endod.* 2000;26(2):92-4.

Gökay O, Ziraman F, Cali Asal A, Saka OM. Radicular peroxide penetration from carbamide peroxide gels during intracoronal bleaching. *Int Endod J.* 2008;41(7):556-60.

Goldstein CE, Goldstein RE, Feinman RA, Garber DA. Bleaching vital teeth: state of the art. *Quintessence Int.* 1989;20(10):729-37.

Goldstein RE, Garber DA. Complete dental bleaching. Chicago: Quintessence; 1995.

Gu W, Chen J, Yang L, Zhao KN. TNF- α promotes IFN- γ -induced CD40 expression and antigen process in Myb-transformed hematological cells. *Scientific World Journal*. 2012;2012:621969.

Guindi C, Menard M, Cloutier A, Gaudreau S, Besin G, Larivee P, et al. Differential role of NF-B, ERK1/2 and AP-1 in modulating the immunoregulatory functions of bone marrow-derived dendritic cells from NOD mice. *Cell. Immunol*. 2012;272(2):259–68.

Hall EJ, Astor M, Bedford J, Borek C, Curtis SB, Fry M, et al. Basic radiobiology. *Am. J. Clin. Oncol*. 1988;11(3):220–52.

Halliwel B, Gutteridge JMC. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem J*. 1984;219(1):1-14.

Han MH, Park C, Jin CY, Kim GY, Chang YC, Moon SK, et al. Apoptosis induction of human bladder cancer cells by sanguinarine through reactive oxygen species mediated up regulation of growth response gene-1. *PLoSOne*. 2013 May 22;8(5):e63425.

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

Haywood VB, Heymann HO. Nightguard vital bleaching. *Quintessence Int*. 1989;20(3):173-6.

Haywood VB. Nightguard vital bleaching: current concepts and reserch. *J Am Dent Assoc*. 1997;128 (Suppl):S19-25.

Heo SJ, Yoon WJ, Kim KN, Oh C, Choi YU, Yoon KT, et al. Anti-inflammatory effect of fucoxanthin derivatives isolated from *Sargassum siliquastrum* in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophage. *Food Chem Toxicol*. 2012 Jun 23;50(9):3336-42.

Hirata R, Kiyan NZ, Miller J. Clareamento de dentes vitalizados: situação clínica atual. *J Brás Odontol Clin*. 1997;1(1):13-21.

Hu M, Pan Z, Yang Y, Meng C, Geng S, You M, et al. Different antigen presentation tendencies of granulocytemacrophage colony-stimulating factor induced bone marrow derived macrophages and periodontal macrophage. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 2012 Aug;48(7):434-40.

Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik MJ. *Imunobiologia: o sistema imune na saúde e na doença*. 6. ed. Porto Alegre: Artmed; 2007.

Jorgensen MG, Carroll WB. Incidence of tooth sensitivity after home whitening treatment. *JADA*. 2002;133(8):1076-82

Jung HA, Jin SE, Ahn BR, Lee CM, Choi JS. Anti-inflammatory activity of edible brown alga *Eisenia bicyclis* and its constituents fucosterol and phlorotannins in LPS-stimulated RAW264.7 macrophages. *Food Chem Toxicol*. 2013 Sep;59:199-206.

Kanno S, Shouji A, Asou K, Ishikawa M. Effects of naringin on hydrogen peroxide-induced cytotoxicity and apoptosis in P388 cells. *J Pharmacol Sci*. 2003;92(4):166-70.

Kawamoto K, Tsujimoto Y. Effect of the hydroxyl radical and hydrogen peroxide on tooth bleaching. *J Endod*. 2004;30(1):45-50.

Kim E, Jeon IS, Kim JW, Kim J, Jung HS, Lee SJ. An MTT based method for quantification of periodontal ligament cell viability. *Oral Diseases*. 2007;13(5):495-9.

Kinomoto Y, Carnes DL Jr, Ebisu S. Cytotoxicity of intracanal bleaching agents on periodontal ligament cells in vitro. *J Endod*. 2001;27(9):574-7.

Koulaouzidou E, Lambrianidis T, Konstantinidis A, Kortsaris AH. In vitro evaluation of the cytotoxicity of a bleaching agent. *Endod Dent Traumatol*. 1998;14(1):21-5.

Kraychete DC, Calasans MTA, Valente CML. Citocinas Pró-inflamatórias e Dor. *Rev Bras Reumatol*. 2006;46(3):199-206.

Krifka S, Hiller KA, Spagnuolo G, Jewett A, Schmalz G, Schweikl H. The influence of glutathione on redox regulation by antioxidant proteins and apoptosis in macrophages exposed to 2-hydroxyethyl methacrylate (HEMA). *Biomaterials*. 2012 Jul;33(21):5177-86.

Krifka S, Petzel C, Hiller KA, Frank EM, Bosl C, Spagnuolo G, et al. Resin monomer-induced differential activation of MAP kinases and apoptosis in mouse macrophages and human pulp cells *Biomaterials*. 2010 Apr;31(11):2964-75.

Kuan YH, Li YC, Huang FM, Chang YC. The upregulation of tumour necrosis factor- α and surface antigens expression on macrophages by bisphenol A-glycidyl-methacrylate. *Int Endod J*. 2012 Jul;45(7):619-26.

Kudo Y, Hiraoka M, Kitagawa S, Miyauchi M, Kakuo S, Zhao M, et al. Establishment of human cementifying fibroma cell lines by transfection with temperature-sensitive Simian Virus-40 T-antigen Gene and hTERT Gene. *Bone*. 2002; 30(5):712–7.

Laroui P, Desai SD, Li TK, Liu AA, Liu LF. Hydrogen peroxide induces topoisomerase 1-mediated DNA damage and cell death. *J Biol Chem*. 2004;279 (15):14587-94.

Lee DS, Li B, Kim KS, Jeong GS, Kim EC, Kim YC. Butein protects human dental pulp cells from hydrogen peroxide-induced oxidative toxicity via Nrf2 pathway-dependent heme oxygenase-1 expressions. *Toxicol In Vitro*. 2013 Mar;27(2):874-81.

Lee MY, Lee JA, Seo CS, Ha H, Lee H, Son JK, et al. Antiinflammatory activity of *Angelica dahurica* ethanolic extract on RAW 264.7 cells. *Food Chem Toxicol*. 2011 May;49(5):1047-55.

Leonardo MR. Endodontia: tratamento de canais radiculares: princípios técnicos e biológicos. São Paulo: Artes Médicas; 2005. 1491p.

Li M, Zhang L, Cai RL, Gao Y, Qi Y. Lipid-soluble Extracts from *Salvia miltiorrhiza* Inhibit Production of LPS-induced Inflammatory Mediators via NF- κ B Modulation in RAW 264.7 Cells and Perform Antiinflammatory Effects In Vivo. *Phytother Res*. 2012 Aug;26(8):1195-204.

Li Y. Biological properties of peroxidecontaining tooth whiteners. *Food and Chemical Toxicology*. 1996;34(5):887-904.

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

Lima AF, Ribeiro AP, Soares DG, Sacono NT, Hebling J, de Souza Costa CA. Toxic effects of daily applications of 10% carbamide peroxide on odontoblast-like MDPC-23 cells. *Acta Odontol Scand*. 2013 Sep;71(5):1319-25.

Liu RH, Yang MH, Xiang H, Bao LM, Yang HA, Yue LW, et al. Depletion of OLFM4 gene inhibits cell growth and increases sensitization to hydrogen peroxide and tumor necrosis factor- α induced-apoptosis in gastric cancer cells. *J Biomed Sci*. 2012 Apr 3;19-38.

Lynn WA, Golenbock DT. Lipopolysaccharide antagonists. *Immunol Today*. 1992 Jul;13(7):271-6.

Ma J, Chen T, Mandelin J, Ceponis A, Miller NE, Hukkanen M, et al. Regulation of macrophage activation. *Cell Mol Life Sci.* 2003 Nov;60(11):2334-46.

Machado LS, de Oliveira FG, Rocha EP, dos Santos PH, Briso AL, Sundefeld ML, et al. Clinical trial evaluating color change and tooth sensitivity throughout and following in-office bleaching. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 2013 Mar Apr;33(2):209-15.

Magalhaes JG, Marimoto AR, Torres CR, Pagani C, Teixeira SC, Barcellos DC. Microhardness change of enamel due to bleaching with in-office bleaching gels of different acidity. *Acta Odontol Scand.* 2012;70(2):122–6.

Matis BA, Moura HN, Cochran MA, Eckert GJ. Clinical evaluation of bleaching agents of different concentrations. *Quintessence Int.* 2000;31(5):303-10.

McGlinchey PG, Spence MS, Patterson CC, Allen AR, Murphy G, Belton C, et al. The intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) gene K469E polymorphism is not associated with ischaemic heart disease: an investigation using family based tests of association. *Eur J Immunogenet.* 2004;31(5):201-6.

McLachlan JL, Sloan AJ, Smith AJ, Landini G, Cooper PR. S100 and cytokine expression in caries. *Infect Immun.* 2004 Jul;72(7):4102-8.

Minoux M, Serfaty R. Vital tooth bleaching: biologic adverse effects-a review. *Quintessence Int.* 2008 Sep;39(8):645-59.

Mulvihill NT, Foley JB, Crean P, Walsh M. Prediction of cardiovascular risk using soluble cell adhesion molecules. *Eur Heart J.* 2002 Oct;23(20):1569-74.

Naik S, Tredwin CJ, Scully C. Hydrogen peroxide tooth-whitening (bleaching): Review of safety in relation to possible carcinogenesis. *Oral Oncology.* 2006;42(7):668–74.

Nathanson D. Vital tooth bleaching: sensitivity and pulpal considerations. *J Am Dent Assoc.* 1997;128(Suppl):41S-44S.

Nocca G, D'Antò V, Riviaccio V, Schweikl H, Amato M, Rengo S, et al. Effects of ethanol and dimethyl sulfoxide on solubility and cytotoxicity of the resin monomer triethylene glycol dimethacrylate. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2012 Aug;100(6):1500-6.

Nordberg J, Arnér ES. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic Biol Med*. 2001 Dec 1;31(11):1287-312.

Ozcan M, Abdin S, Sipahi C. Bleaching induced tooth sensitivity: do the existing enamel craze lines increase sensitivity? A clinical study. *Odontology*. 2013 Mar 12.

Papathanasiou A, Kastali S, Perry RD, Kugel G. Clinical evaluation of a 35% hydrogen peroxide in-office whitening system. *Compend Contin Educ Dent*. 2002;23(4):335-46.

Pashley DH, Andringa HJ, Derkson GD, Derkson ME, Kalathoor SR. Regional variability in permeability of human dentine. *Arch Oral Biol*. 1987;32(7):519-23.

Pazmandi K, Magyarics Z, Boldogh I, Csillag A, Rajnavolgyi E, Bacsí A. Modulatory effects of low-dose hydrogen peroxide on the function of human plasmacytoid dendritic cells. *Free Radic Biol Med*. 2012 Feb 1;52(3):635-45.

Pi S-H, Lee S-K, Hwang Y-S, Choi M-G, Lee S-K, Kim E-C. Differential expression of periodontal ligament-specific markers and osteogenic differentiation in human papilloma virus 16-immortalized human gingival fibroblasts and periodontal ligament cells. *J Periodont Res*. 2007;42(2):104–13.

Pugh Jr G, Zaidel L, Lin N, Stranick M, Bagley D. High levels of hydrogen peroxide in overnight tooth-whitening formulas: effects on enamel and pulp. *J Esthet Restor Dent*. 2005;17(1):40–5.

Raftos JE, Whillier S, Chapman BE, Kuchel PW. Kinetics of uptake and deacetylation of N-acetylcysteine by human erythrocytes, *Int. J. Biochem. Cell Biol*. 2007;39:1698–706.

Ramp WK, Arnold RR, Russell JE, Yancey JM. Hydrogen peroxide inhibits glucose metabolism and collagen synthesis in bone. *J Periodontol*. 1987;58(5):340-4.

Reliene R, Pollard JM, Sobol Z, Trouiller B, Gatti RA, Schiestl RH. N-acetyl cysteine protects against ionizing radiation-induced DNA damage but not against cell killing in yeast and mammals. *Mutat Res*. 2009 Jun 1;665(1-2):37-43.

Rezende TMB, Vieira LQ, Cardoso FP, Oliveira RR, Oliveira Mendes ST, Jorge MLR, et al. The effect of mineral trioxide aggregate on phagocytic activity and production of reactive oxygen, nitrogen species and arginase activity by M1 and M2 macrophages. *Int Endod J*. 2007;40(8):603–11.

Ribeiro DA, Marques ME, Salvadori DM. Assesment of genetic damage induced by dental bleaching agents on mouse lymphoma cells by using single cell gel (comet) assay. *J Oral Rehabil*. 2005;32(10):766-71.

Ribeiro DA, Marques ME, Salvadori DM. Study of DNA damage induced by dental bleaching agents in vitro. *Braz Oral Res*. 2006 Jan-Mar;20(1):47-51.

Riches DW, Chan ED, Winston BW. TNF-alpha-induced regulation and signalling in macrophages. *Immunobiology*. 1996;195(4-5):477-90.

Riedl MA, Nel AE. Importance of oxidative stress in the pathogenesis and treatment of asthma. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2008 Feb;8(1):49-56.

Rincheval V, Bergeaud M, Mathieu L, Leroy J, Guillaume A, Mignotte B, et al. Differential effects of Bcl-2 and caspases on mitochondrial permeabilization during endogenous or exogenous reactive oxygen species-induced cell death: a comparative study of H₂O₂, paraquat, t-BHP, etoposide and TNF- α -induced cell death. *Cell Biol Toxicol*. 2012 Aug;28(4):239-53.

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

Salles MJC, Sprovieri SRS, Bedrikow R, Pereira AC, Cardenuto SL, Azevedo PRC, et al. Síndrome da resposta inflamatória sistêmica/sepsis – revisão e estudo da terminologia e fisiopatologia. *Rev Ass Med Brasil*. 1999;45(1):86-92.

Sato C, Rodrigues FA, Garcia DM, Vidal CM, Pashley DH, Tjäderhane L, et al. Tooth bleaching increases dentinal protease activity. *J Dent Res*. 2013 Feb;92(2):187-92.

Schmalz G. Use of cell cultures for toxicity testing of dental materials-advantages and limitations. *J Dent*. 1994;22(Suppl 2):S6-11.

Schmalz G, Krifka S, Schweikl H. Toll-like receptors, LPS, and dental monomers. *Adv Dent Res*. 2011 Jul;23(3):302-6.

Schweikl H, Spagnuolo G, Schmalz G. Genetic and cellular toxicology of dental resin monomers. *J Dent Res*. 2006;85(10):870-7.

Shackelford RE, Kaufmann WK, Paules RS. Oxidative stress and cell cycle checkpoint function. *Free Rad Biol Medic*. 2000;28(9):1387–404.

Shay JW, Wright WE, Werbin H. Defining the molecular mechanisms of human cell immortalization. *Biochim Biophys Acta*. 1991;1072(1):1-7.

Silveira RL. Considerações críticas e metodológicas na determinação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio em células musculare durante contrações. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2004;48(6):812-22.

Simon RH, Scoggin CH, Patterson D. Hydrogen peroxide causes the fatal injury to human fibroblast exposed to oxygen radicals. *J Biol Chem*. 1981;256(14):7181-6.

Sjodin K, Nilsson E, Hallberg A, Tunek A. Metabolism of N-acetyl-L-cysteine. Some structural requirements for the deacetylation and consequences for the oral bioavailability, *Biochem. Pharmacol*. 1989;38:3981-5.

Slupphaug G, Kavli B, krokan HE. The interacting pathways for prevention and repair of oxidative DNA damage. *Mutat Res*. 2003;531(1-2):231-51.

Soares DG, Ribeiro AP, da Silveira Vargas F, Hebling J, de Souza Costa CA. Efficacy and cytotoxicity of a bleaching gel after short application times on dental enamel. *Clin Oral Investig*. 2012 Dec 6.

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

Spagnuolo G, D'Anto V, Cosentino C, Schmalz G, Schweikl H, Rengo S. Effect of N-acetyl-L-cysteine on ROS production and cell death caused by HEMA in human primary gingival fibroblasts. *Biomater*. 2006;27(9):1803-9.

Sulieman M, Addy M, Macdonald E, Rees JS. The bleaching depth of a 35% hydrogen peroxide based in-office product: a study in vitro. *J Dent*. 2005;33(1):33-40.

Sulieman M, Addy M, Macdonald E, Rees J. The effect of hydrogen peroxide concentration on the outcome of tooth whitening: a in vitro study. *J Dent*. 2004;32(4):295-9.

Takeuchi M, Takeuchi K, Kohara A, Satoh M, Shioda S, Ozawa Y, et al. Chromosomal instability in human mesenchymal stem cells immortalized with human papilloma virus E6, E7, and hTERT genes. *In Vitro Cell Dev Biol-Animal*. 2007;43(3-4):129–38.

Thitinanthapan W, Satamanont P, Vongsavan N. In vitro penetration of the pulp chamber by three brands of carbamide peroxide. *J Esthet Dent*. 1999;11(5):259-64.

Thonemann B, Schmalz G. Bovine dental papilla-derived cells immortalized with HPV 18 E6/E7. *Eur J Oral Sci*. 2000;108(5):432-41.

Tipton DA, Braxton SD, Dabbous MK. Effects of a bleaching agent on human gingival fibroblasts. *J Periodontol*. 1995;66(1):7-13.

Tredwin CJ, Naik S, Lewis NJ, Scully C. Hydrogen peroxide tooth-whitening (bleaching) products: Review of adverse effects and safety issues. *Br Dent J*. 2006;200(7):371-6.

Ulker HE, Hiller KA, Schweikl H, Seidenader C, Sengun A, Schmalz G. Human and bovine pulp-derived cell reactions to dental resin cements. *Clin Oral Investig*. 2012 Dec;16(6):1571-8.

Van Kooten C, Banchereau J. CD40-CD40 ligand. *J Leukoc Biol*. 2000;67(1):2-17.

Weiss JF, Landauer MR. Radioprotection by antioxidants. *Ann N Y Acad Sci*. 2000;899:44-60.

Wilhelmi V, Fischer U, van Berlo D, Schulze-Osthoff K, Schins RP, Albrecht C. Evaluation of apoptosis induced by nanoparticles and fine particles in RAW 264.7 macrophages: facts and artefacts. *Toxicol In Vitro*. 2012 Mar;26(2):323-34.

Zafarullah M, Li WQ, Sylvester J, Ahmad M. Molecular mechanisms of N-acetylcysteine actions *Cell. Mol Life Sci*. 2003;60(1):6–20.

Zanoni I, Ostuni R, Barresi S, Di Gioia M, Broggi A, Costa B, et al. CD14 and NFAT mediate lipopolysaccharide-induced skin edema formation in mice. *J Clin Invest*. 2012 May 1;122(5):1747-57.

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

Zhang T, Tang M, Kong L, Li H, Zhang T, Zhang S, et al. Comparison of cytotoxic and inflammatory responses of pristine and functionalized multi-walled carbon nanotubes in RAW 264.7 mouse macrophages. *J Hazard Mater.* 2012 Jun 15;219-220:203-12.

ANEXO A – Gráficos para análise complementar teste MTT

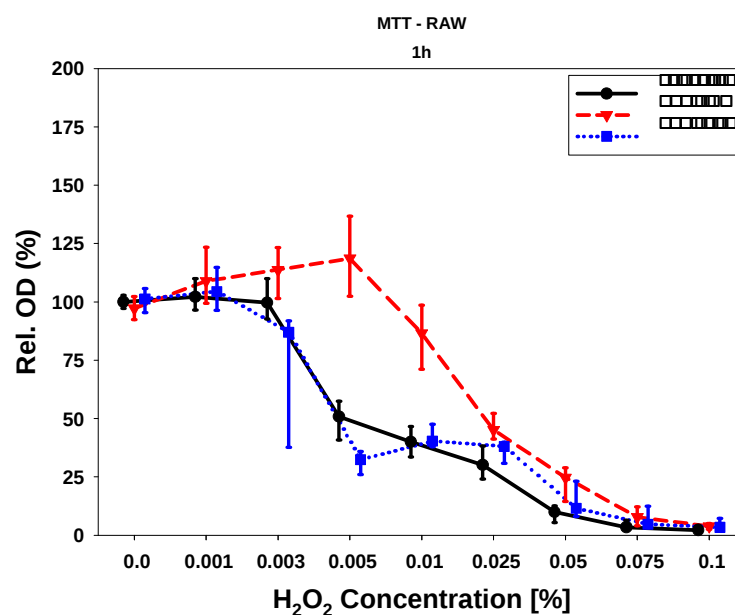


Figura 19- Gráfico de linhas ilustrando o efeito do H₂O₂ 10% na viabilidade celular no período de 1 hora.

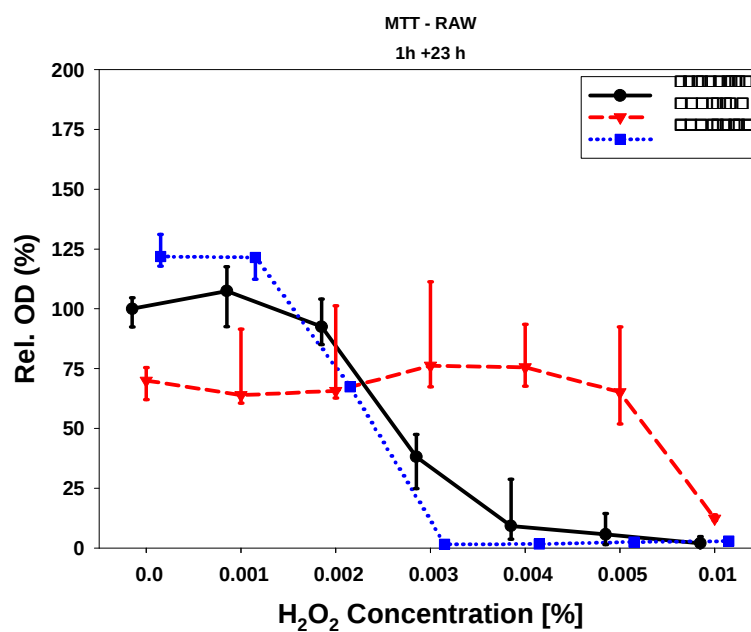


Figura 20- Gráfico de linhas ilustrando o efeito do H₂O₂ 10% na viabilidade celular no período de 1 hora + 23 horas.

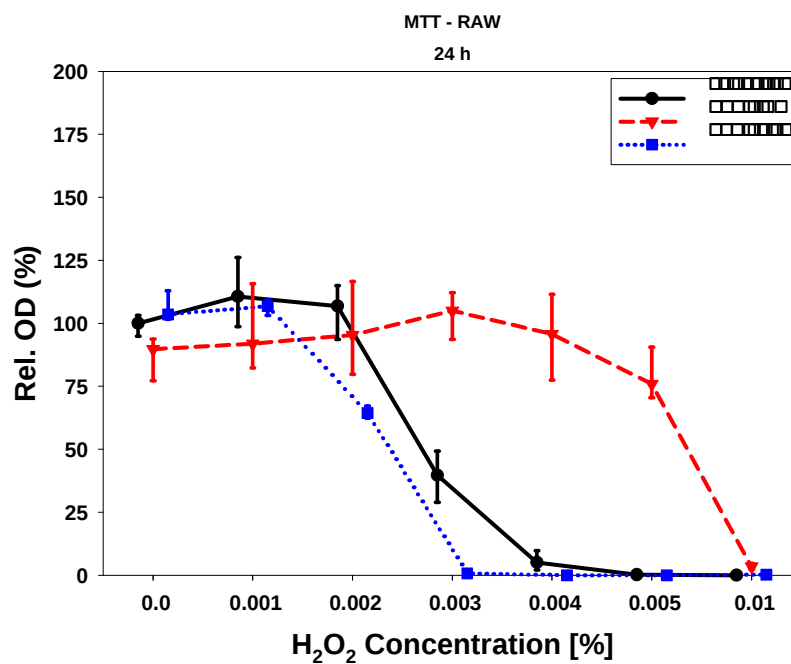


Figura 21- Gráfico de linhas ilustrando o efeito do H₂O₂ 10% na viabilidade celular no período de 24 horas.

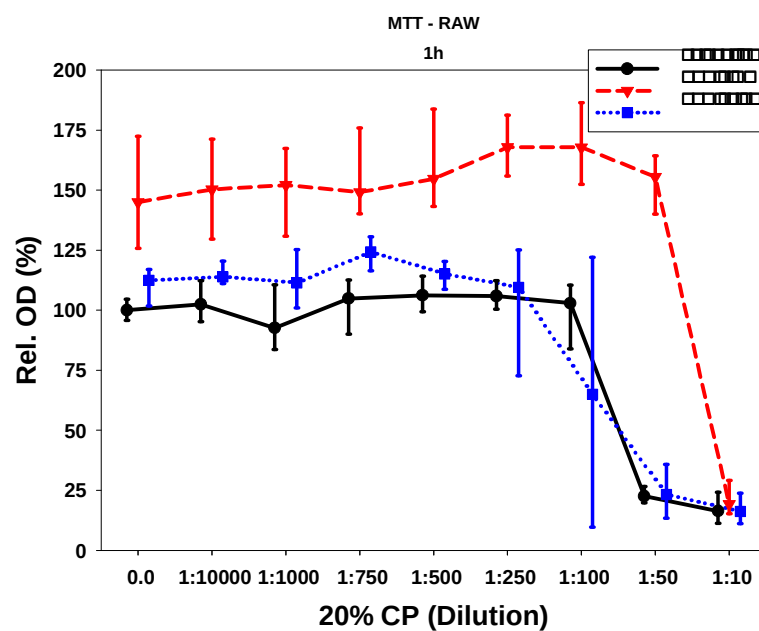


Figura 22- Gráfico de linhas ilustrando o efeito do Peróxido de Carbamida 20% na viabilidade celular no período de 1 hora.

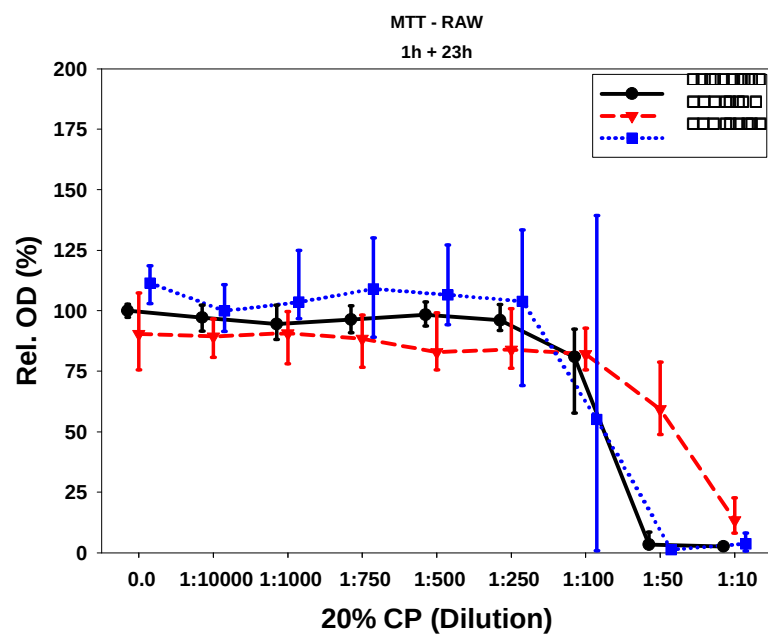


Figura 23- Gráfico de linhas ilustrando o efeito do Peróxido de Carbamida 20% na viabilidade celular no período de 1 hora + 23 horas.

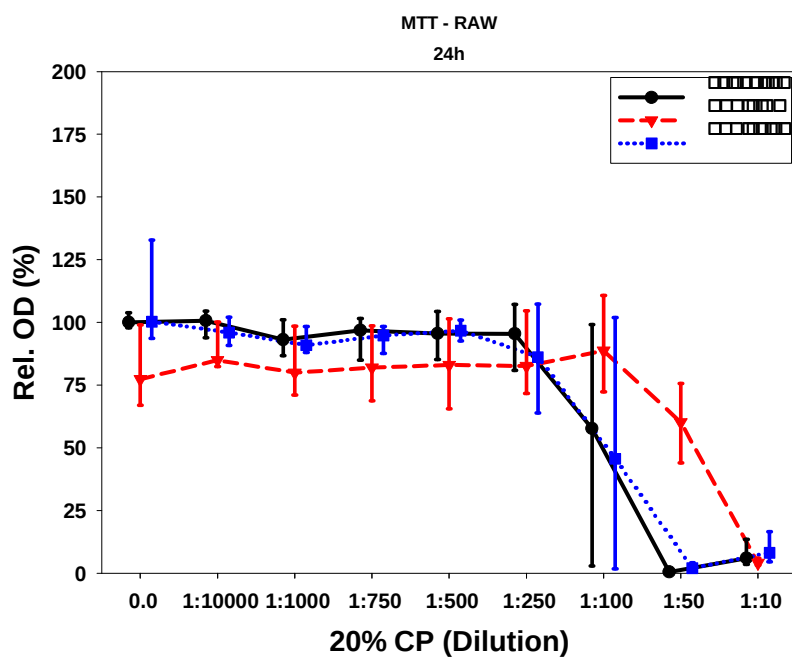


Figura 24- Gráfico de linhas ilustrando o efeito do Peróxido de Carbamida 20% na viabilidade celular no período de 24 horas.

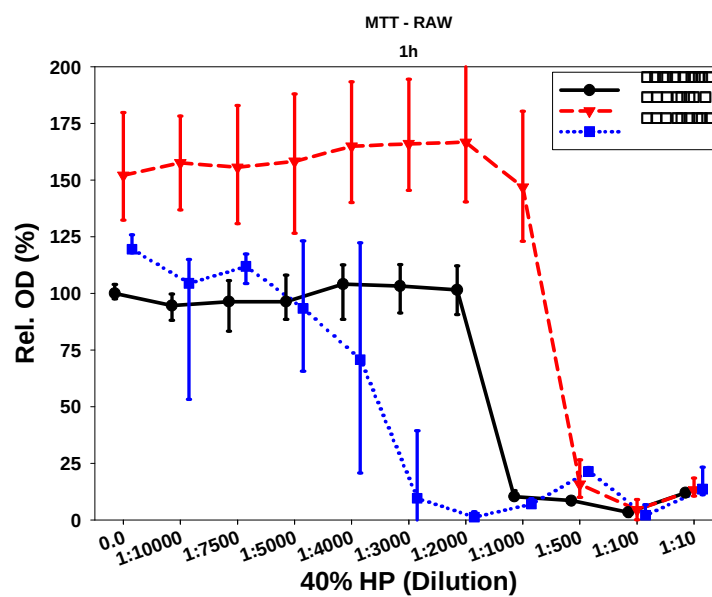


Figura 25- Gráfico de linhas ilustrando o efeito do Peróxido de Hidrogênio 40% na viabilidade celular no período de 1 hora.

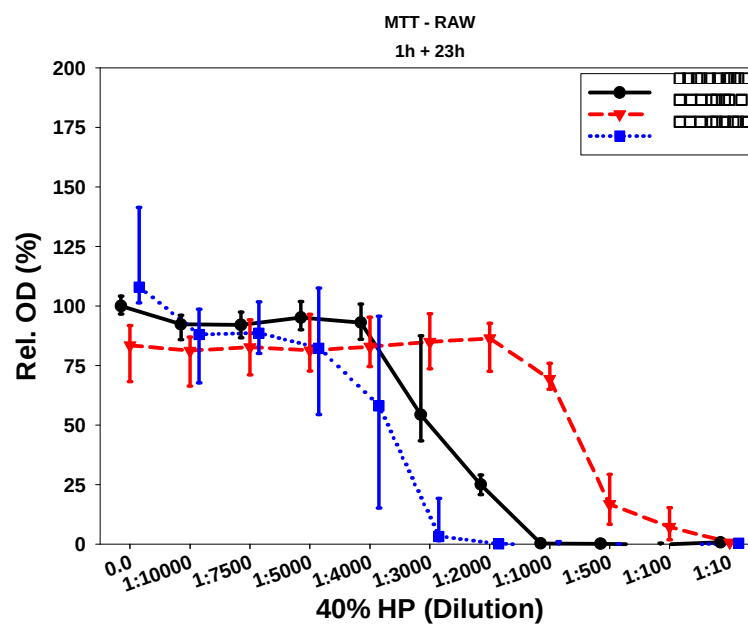


Figura 26- Gráfico de linhas ilustrando o efeito do Peróxido de Hidrogênio 40% na viabilidade celular no período de 1 hora + 23 horas.

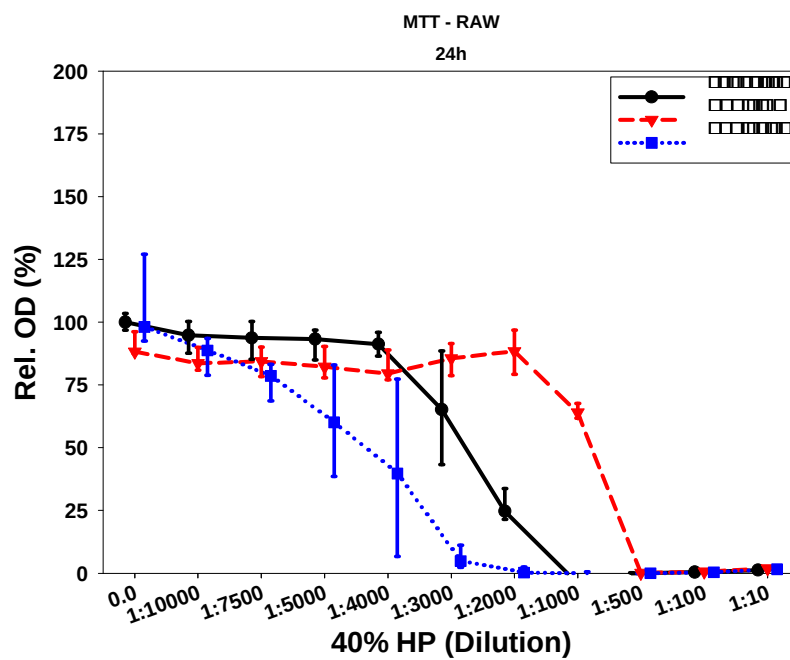


Figura 27- Gráfico de linhas ilustrando o efeito do Peróxido de Hidrogênio 40% na viabilidade celular no período de 24 horas.

ANEXO B – Gráficos para análise complementar teste KVT

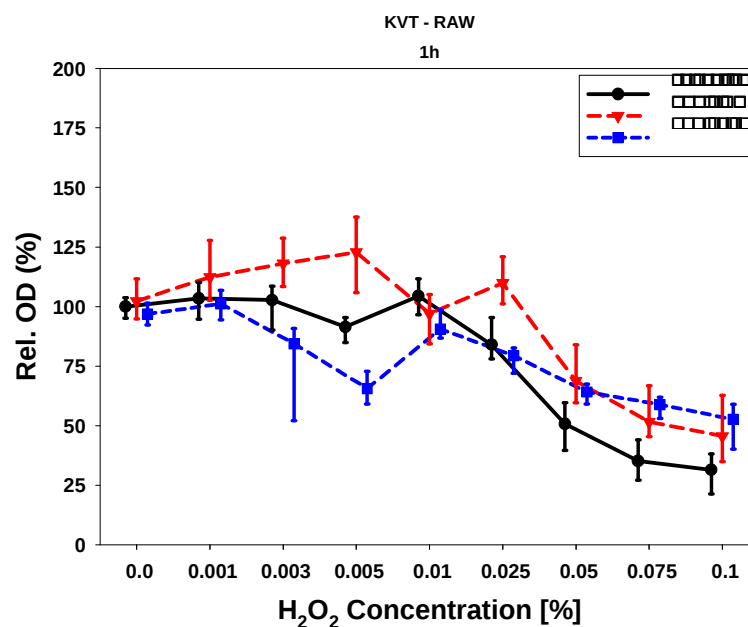


Figura 28- Gráfico de linhas ilustrando o efeito do H₂O₂ 10% na sobrevivência celular no período de 1 hora.

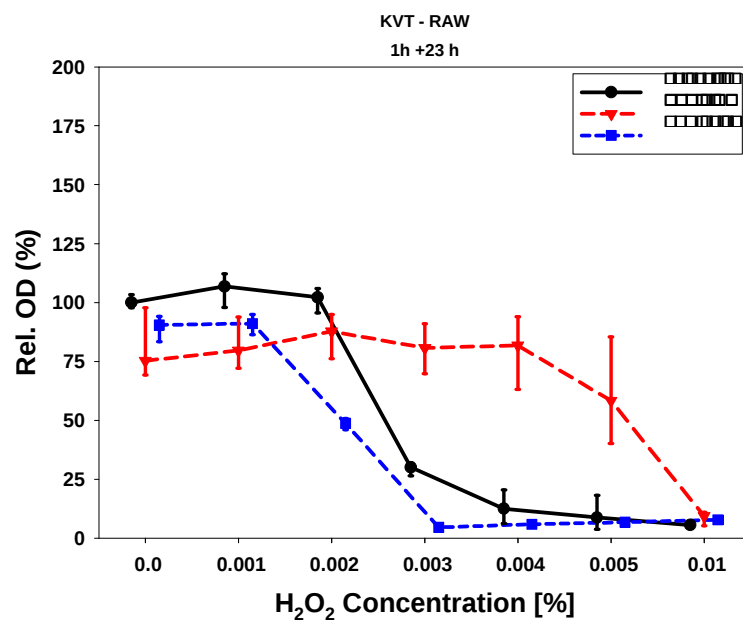


Figura 29- Gráfico de linhas ilustrando o efeito do H₂O₂ 10% na sobrevivência celular no período de 1 hora + 23 horas.

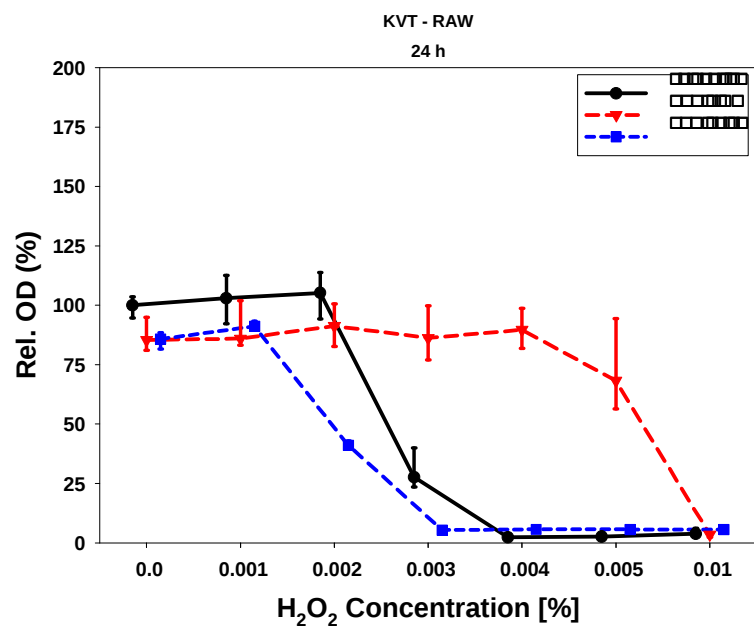


Figura 30- Gráfico de linhas ilustrando o efeito do H₂O₂ 10% na sobrevivência celular no período de 24 horas.

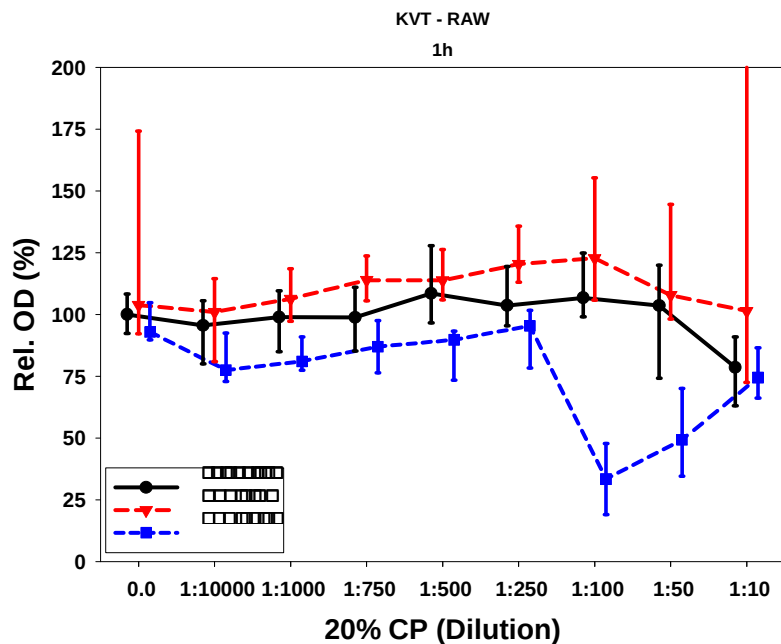


Figura 31- Gráfico de linhas ilustrando o efeito do Peróxido de Carbamida 20% na sobrevivência celular no período de 1 hora.

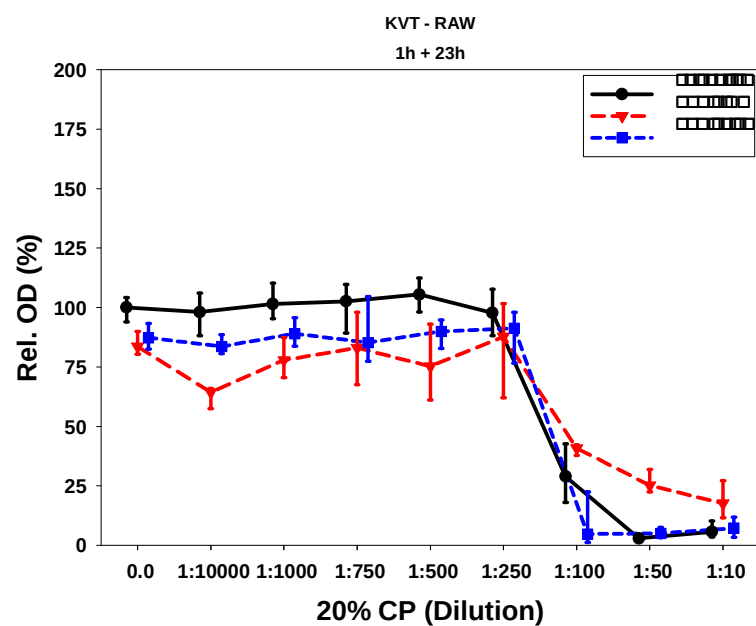


Figura 32- Gráfico de linhas ilustrando o efeito do Peróxido de Carbamida 20% na sobrevivência celular no período de 1 hora + 23 horas.

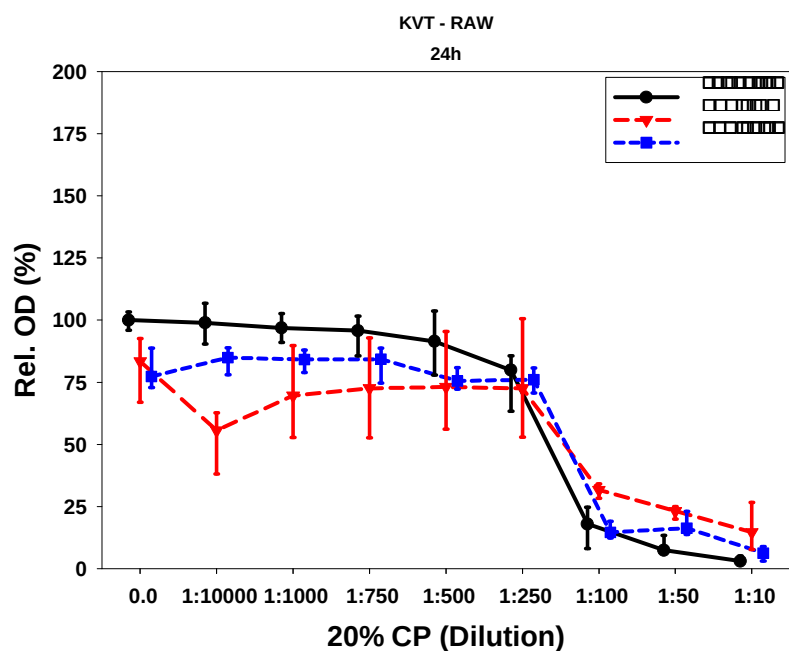


Figura 33- Gráfico de linhas ilustrando o efeito do Peróxido de Carbamida 20% na sobrevivência celular no período de 24 horas.

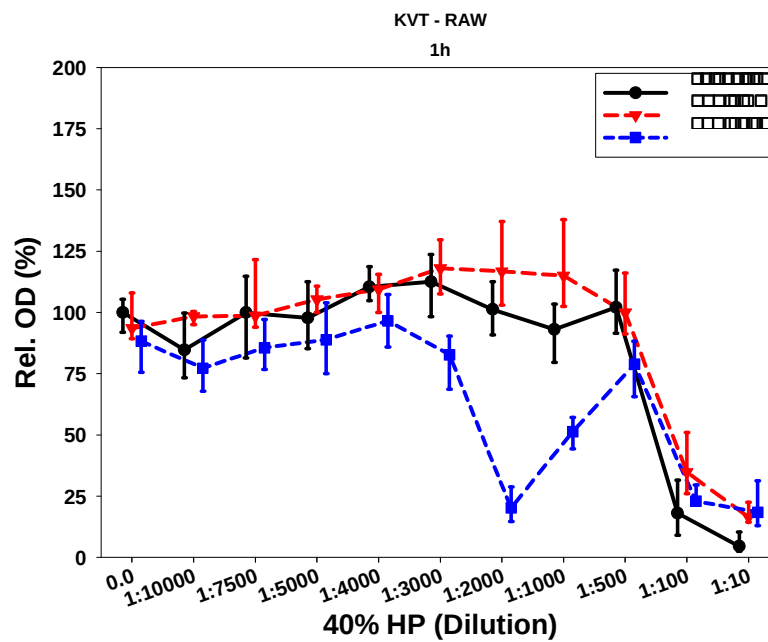


Figura 34- Gráfico de linhas ilustrando o efeito do Peróxido de Hidrogênio 40% na sobrevivência celular no período de 1 hora.

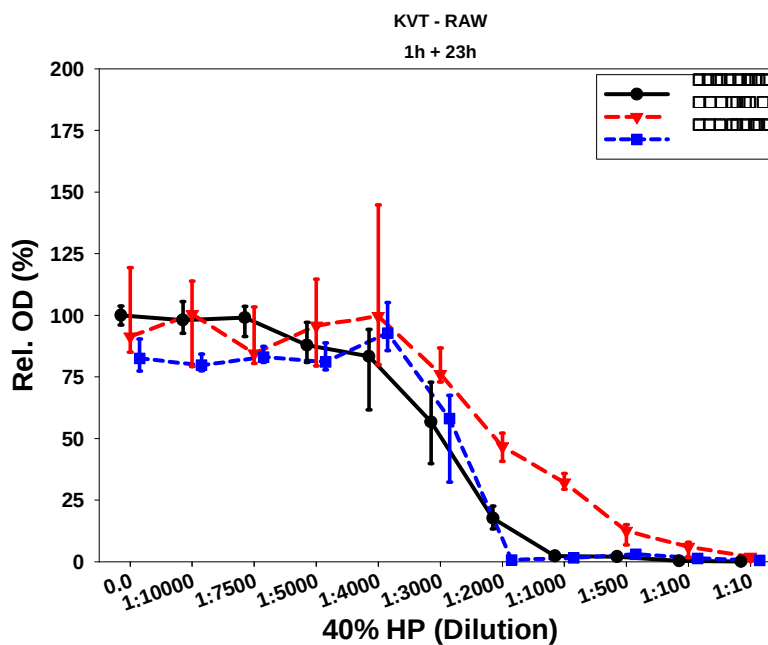


Figura 35- Gráfico de linhas ilustrando o efeito do Peróxido de Hidrogênio 40% na sobrevivência celular no período de 1 hora + 23 horas.

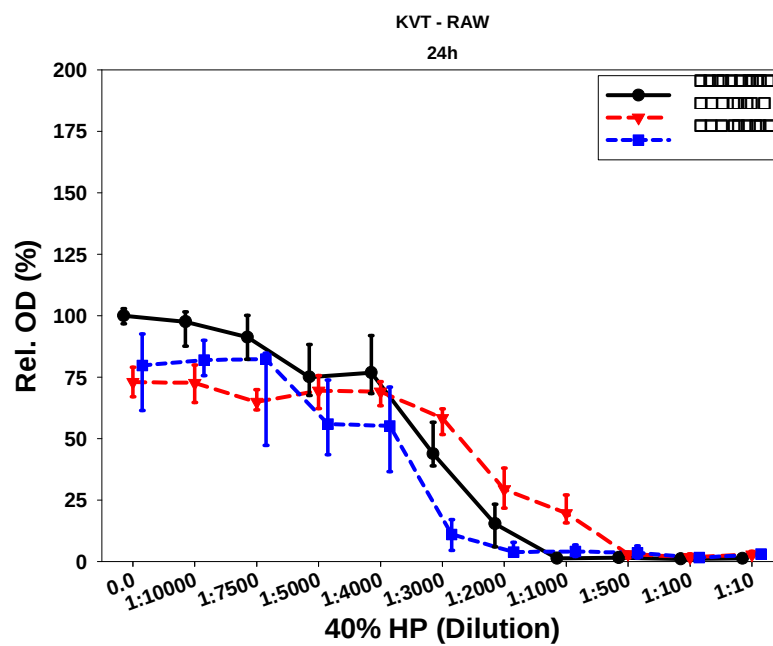


Figura 36- Gráfico de linhas ilustrando o efeito do Peróxido de Hidrogênio 40% na sobrevivência celular no período de 24 horas.

ANEXO C – Gráficos para análise complementar teste ELISA

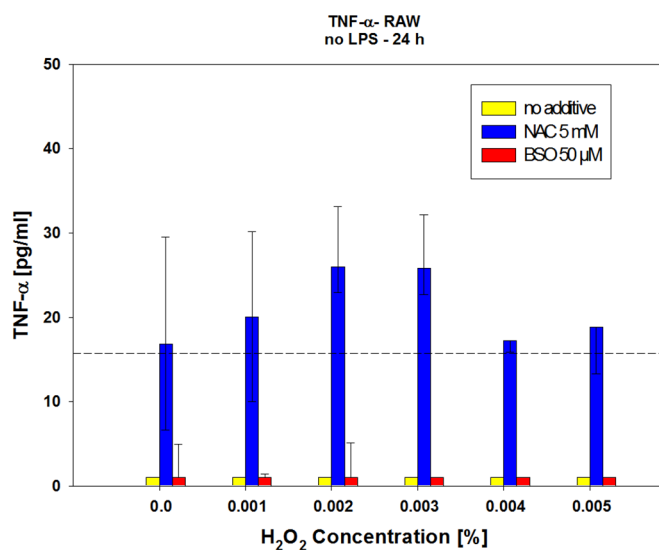


Figura 37- Gráfico de barras ilustrando o efeito do H₂O₂ 10% na produção de TNF α .

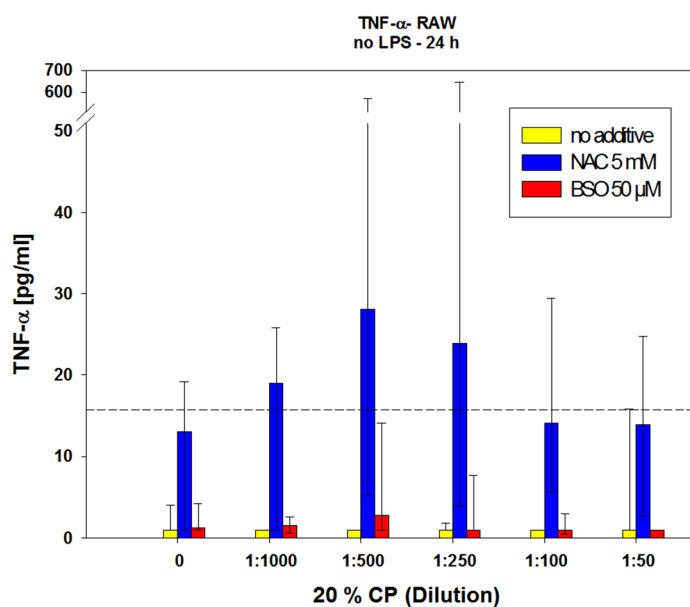


Figura 38- Gráfico de barras ilustrando o efeito do Peróxido de Carbamida 20% na produção de TNF α .

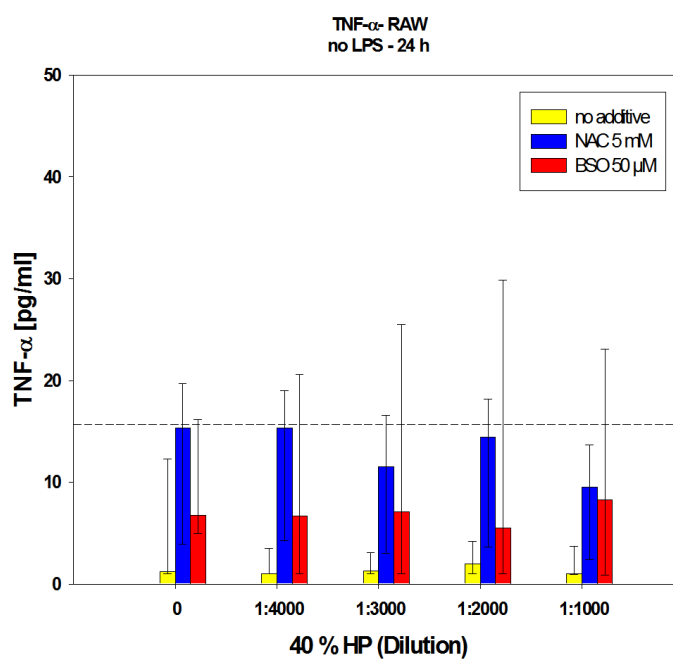


Figura 39- Gráfico de barras ilustrando o efeito do Peróxido de Hidrogênio 40% na produção de TNF α .