



UNESP – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



FERNANDA DA SILVEIRA VARGAS

**EFEITO PROTETOR DA VITAMINA E (α -TOCOFEROL) CONTRA A
ATIVIDADE CITOTÓXICA DO PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO**

Araraquara

2013



UNESP – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Faculdade de Odontologia de Araraquara



FERNANDA DA SILVEIRA VARGAS

**EFEITO PROTETOR DA VITAMINA E (α -TOCOFEROL) CONTRA A
ATIVIDADE CITOTÓXICA DO PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reabilitação Oral – Área Prótese, da Faculdade de Odontologia de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista, para obtenção do título de Mestre em Reabilitação Oral.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto de Souza Costa

Araraquara

2013

Vargas, Fernanda da Silveira.

**Efeito protetor da vitamina E (α -Tocoferol) contra a atividade citotóxica do peróxido de hidrogênio / Fernanda da Silveira Vargas.
– Araraquara: [s.n.], 2013.**

76 f. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia

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

1. Vitamina E 2. Odontoblastos 3. Clareamento dental.
I. Título

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária Ceres Maria Carvalho Galvão de Freitas, CRB-8/4612, Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação da Faculdade de Odontologia de Araraquara / UNES

FERNANDA DA SILVEIRA VARGAS

**EFEITO PROTETOR DA VITAMINA E (α -TOCOFEROL) CONTRA
A ATIVIDADE CITOTÓXICA DO PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO**

COMISSÃO JULGADORA

Presidente e Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto de Souza Costa

1° Examinador: Prof.Dr. Gelson Luis Adabo

2° Examinador: Prof.Dr. Adriano Fonseca de Lima

Araraquara, 05 de Março de 2013

DADOS CURRICULARES

Nascimento

Data: 05/11/1986

Araraquara, SP, Brasil

Filiação

Pai: Durvalino Vargas

Mãe: Sônia Fernandes da Silveira Vargas

2005-2010

Curso de graduação

Faculdade de Odontologia de Araraquara

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – UNESP

Araraquara, SP, Brasil

2011-2013

Curso de Mestrado – Área de Prótese

Programa de Pós-Graduação em Reabilitação Oral

Faculdade de Odontologia de Araraquara

Universidade Estadual Paulista - UNESP

Dedicatória



Dedicatória

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, por ter me dado a oportunidade de aprender, a saúde para trabalhar, a fé para acreditar que tudo é possível, e por ser o responsável por sempre guiar o meu caminho com sabedoria.

Aos meus pais Sonia F. da Silveira Vargas e Durvalino Vargas, a minha irmã Karina da Silveira Vargas, por sempre me apoiarem. Agradeço pelos conselhos, pela atenção, pela participação em minha vida nos momentos felizes e tristes, pois sem vocês eu não seria ninguém.

Ao meu esposo Adail Miller Regatieri, pelo apoio e cumplicidade, entendendo, muitas vezes, a minha ausência.

Ao meu orientador Prof. Dr. Carlos Alberto de Souza Costa por me dar credibilidade para trabalhar em seu laboratório. Isso foi muito importante para mim.

OBRIGADA !

Agradecimientos



Agradecimentos

À Faculdade de Odontologia de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” – UNESP, em especial a Diretora Prof^a. Dr^a. Andréia Affonso Barretto Montandon e a Vice-diretora Prof^a. Dr^a. Elaine Maria Sgavioli Massucato.

Ao Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, representados pelo Chefe do Departamento Prof. Dr. Francisco de Assis Mollo Jr. e pelo Vice-chefe Prof. Dr. Gelson Luis Adabo.

À Coordenadoria da Pós-Graduação em Reabilitação Oral da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, representados pelo Coordenador Prof. Dr. Carlos Eduardo Vergani e pela Vice-coordenadora Prof^a. Dr^a. Ana Cláudia Pavarina.

À todas as pessoas que contribuíram de alguma maneira, com o meu trabalho, principalmente ao meu orientador Prof. Dr. Carlos Alberto de Souza Costa, pela oportunidade.

Agradeço por estar ao lado de pessoas maravilhosas como as Doutorandas Fernanda Basso, Ana Paula Turrioni e Luciana Bianchi. Aos meus colegas de Mestrado Elaine Pontes e Eduardo Mariscal. Aos estagiários e Bolsistas de Iniciação Científica Taisa Pansani, Júlia Pastana, Jonas Bianchi e principalmente Carla Duque, da qual tive oportunidade de participar na orientação.

À Doutoranda Diana Soares, por me conduzir com sabedoria, sempre me ajudando, pois cresci muito. Agradeço também pelos conselhos e conversas divertidas.

À imprescindível colaboração da Prof^a. Dr^a. Josimeri Hebling e da Prof^a. Dr^a. Ana Paula Dias Ribeiro, as quais participaram efetivamente no desenvolvimento e conclusão deste trabalho de pesquisa.

À minha família de Taquaritinga por fazerem me sentir em casa!

À Técnica do laboratório Juliana Garcia Pirola.

Aos meus amigos do Mestrado Fernanda Alves, Chaiene Zago, Geraldo Camilo, Bruna Alfenas, Andressa Perin, Danny Marin, Beatriz Panarielo e Beatriz Regalado, pelo incentivo nos seminários na busca de novos conhecimentos.

Às Agências Financiadoras Capes e FAPESP (Bolsa MS: 2011/15366-5) por terem me contemplado com a Bolsa de Mestrado, as quais permitiram a completa execução desta Dissertação de Mestrado.

Vargas FS. Efeito protetor da Vitamina E (α -Tocoferol) contra a atividade citotóxica do peróxido de hidrogênio [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2013.

Resumo

O clareamento dental de consultório, realizado com géis que apresentam elevada concentração de peróxido de hidrogênio (PH), pode causar danos intensos para as células da polpa dentária. Dentro deste contexto, a administração de agentes antioxidantes previamente ao clareamento dental, tem sido considerada uma terapia promissora, pois pode eliminar ou pelo menos minimizar os efeitos adversos deste procedimento clínico estético. Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar o possível efeito protetor da Vitamina E (alfa-Tocoferol / α -T) contra à ação citotóxica do PH sobre células odontoblastóides (MDPC-23). Para isto, células foram semeadas em placas de 96 wells durante 72 horas e então submetidas a diferentes tempos de pré-tratamento (1, 4, 8 e 24 horas) com variadas concentrações de α -T (1, 3, 5 e 10 mM). Após os períodos de pré-tratamento, as células foram expostas ou não ao PH (0,018%) durante 30 minutos. Nos grupos controle positivo e negativo, as células foram somente expostas a uma solução de PH (0,018%) ou meio de cultura, respectivamente. O metabolismo celular foi avaliado pelo teste de MTT. A absorbância foi transformada em porcentagem e analisada pelo Teste de Kruskal-Wallis, complementado por Mann-Whitney ($\alpha=0,05\%$). Todas as concentrações de α -T e tempos de pré-tratamento propostos neste estudo apresentaram proteção das células contra os efeitos citotóxicos do PH. Porém, os melhores resultados foram obtidos com as concentrações de 1 e 3 mM (126% e 97%, respectivamente) por 24 horas em relação a 41% de metabolismo celular do grupo controle positivo ($p<0,05$). Portanto, as células pré-tratadas com α -T por 24 horas, em concentrações baixas (1 e 3 mM), apresentaram os melhores resultados de viabilidade celular, ou seja, maior efeito protetor frente à agressão direta do PH.

Palavras-chave: vitamina E, odontoblastos, clareamento dental

Vargas FS. Protective effect of vitamin E (α -tocopherol) against the cytotoxicity of hydrogen peroxide [Dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2013.

Abstract

The in-office tooth bleaching using gels with high concentrations of hydrogen peroxide (HP) may cause irreversible damage to pulp tissue. Therefore, the administration of antioxidizing agents previously to the tooth bleaching procedures has been considered as a promising therapy, mainly due the capacity of these agents to prevent, or at last reduce, the negative side-effects caused by toxic products used in this esthetic treatment. Therefore, the aim of the present *in vitro* study was to evaluate the protective activity of vitamin E (alfa-Tocoferol / α -T) against the toxic effects of HP applied to cultured odontoblast-like cells (MDPC-23). Cells were seeded in wells of 96-well plates for 72 hs and then pre-treated with different concentrations of α -T (1, 3, 5, and 10 mM) for variable periods (1, 4, 8, and 24 hs). Following, the cells were exposed to a HP solution (0,018%) for 30 min. In positive and negative control groups, the cells were exposed only to HP solution (0,018%) or culture medium, respectively. The cell metabolism was assessed by MTT assay and the absorbance numeric data, expressed as percentage values, were subjected to the statistical analysis of Kruskal-Wallis complemented by Mann-Whitney test ($\alpha=0.05\%$). All α -T concentrations and pre-treatments evaluated in this study showed cell protection against the cytotoxic effects of HP. However, considering the MDPC-23 cells in the negative control group as presenting 100% metabolism, it was observed that the most relevant data occurred when the cells were pre-treated with α -T at 1 and 3 mM (126% and 97% of cell metabolism, respectively) for 24hs compared to the positive control group (41%) ($p<0.05$). Based upon the methodology used in the present investigation, it can be concluded that low concentrations of α -T (1 and 3 mM) applied for 24 hs to the cultured odontoblast-like MDPC-23 cells provide the best protective effects against the cytotoxicity caused by hydrogen peroxide.

Key-works: vitamin E, odontoblast-like cells, tooth bleaching

Lista de abreviaturas

α -T: Alfa-Tocoferol

AS: Ascorbato de sódio

CAT: Catalase

CIV: Cimento de ionômero de vidro

CPA's: Câmaras pulpares artificiais

DAC: Doença arterial coronariana

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMSO: Dimetil sulfóxido

EROS: Espécies reativas de Oxigênio

GSH: Glutathione peroxidase

HD: Hemodialise

IL: Interleucina

MDA: Malondialdeído

MEV: Microscopia eletrônica de varredura

MTT: Teste de metil tetrazolium

NAC: N-acetil cisteína

NO: Oxido nítrico

PC: Peróxido de carbamida

PH: Peróxido de hidrogênio

PMMA: Polimetil metacrilato

PUFA: Ácidos graxos poli-insaturados

RC: Resina composta

SE: Selênio

SOD: Superoxido dismutase

STZ: Streptozocina

T: Tocoferóis

TAP: Proteína de ligação do α -T

TE: Tocotrienóis

TNF- α : Fator de necrose tumoral α

VC: Vitamina C

VE: Vitamina E

XO: Xantina Oxidase

Sumário

INTRODUÇÃO.....	17
REVISÃO DA LIERATURA.....	21
PROPOSIÇÃO.....	46
MATERIAL E METÓDO.....	48
RESULTADO.....	53
DISCUSSÃO.....	57
CONCLUSÃO.....	63
REFERÊNCIAS.....	65
ANEXO 1.....	72

Introdução

The page features a decorative graphic in the bottom right corner consisting of several overlapping, wavy lines in shades of green and yellow, creating a sense of movement and depth.

Introdução

Na atualidade, o clareamento dental é um procedimento bastante requisitado nos consultórios odontológicos. Em estudo recente, foi constatado que cerca de 50% dos pacientes que buscaram tratamento odontológico apresentaram como queixa principal a insatisfação com a coloração dos dentes ⁶⁷. Os agentes clareadores disponíveis no mercado odontológico têm seus mecanismos de ação baseados na atividade oxidativa do peróxido de hidrogênio (PH) sobre moléculas orgânicas complexas presentes na estrutura dental, as quais são responsáveis pela coloração escurecida do dente ⁶⁵. Estas moléculas concentram-se no tecido dentinário, o qual é um substrato altamente permeável, devido a sua característica tubular ⁵³. Já foi demonstrado, em estudos *in vitro*, que a aplicação de agentes clareadores com altas concentrações de PH e por longos períodos sobre o esmalte pode resultar na difusão desta espécie reativa do oxigênio (EROS) através dos tecidos duros do dente ^{9,12,20,29}.

Pesquisas *in vitro* mostraram que os géis clareadores da técnica de consultório apresentaram elevada citotoxicidade trans-amelodentinária sobre células odontoblastóides, caracterizada pela redução da atividade mitocondrial e severas alterações morfológicas ^{18,68,23}. Além disso, foi demonstrada, em estudo *in vivo*, a ocorrência de necrose parcial da polpa coronária de incisivos inferiores humanos após o clareamento dental com um gel contendo 38% de PH ²¹. Sabe-se que o PH apresenta elevado poder oxidativo, capaz de promover importantes danos celulares, tais como lesão de membrana celular por peroxidação lipídica, fragmentação de proteínas e alterações no DNA ⁴⁷. Desta maneira, a difusão trans-amelodentinária do PH e o acúmulo deste composto tóxico na câmara pulpar coronária pode ser o principal causador da sensibilidade pós-clareamento dental e da lesão pulpar irreversível demonstrada por de Souza Costa et al. ²¹ (2010) em dentes humanos.

Tem sido sugerido haver uma relação direta entre a sensibilidade dental e a concentração de PH no gel clareador, ou seja, a sensibilidade durante e pós-clareamento dental é mais intensa quando agentes clareadores com elevadas concentrações de PH são utilizados ⁴⁶. Com a finalidade de minimizar os danos oxidativos de compostos químicos sobre as células, a administração de agente


antioxidante previamente ao procedimento clínico tem sido proposta ^{40,44,51,74}. Dentre os agentes disponíveis, as vitaminas representam um grupo de interesse, pois participam na regulação da resposta imune agindo como antioxidantes e anti-inflamatórios, tal como demonstrado em estudos in vivo desenvolvidos em seres humanos ^{34,52}. A vitamina C (VC) e a vitamina E (VE), hidrossolúvel e lipossolúvel, respectivamente, são consideradas antioxidantes efetivos. Estas vitaminas estão envolvidas na manutenção de reações anti-oxidativas e na proteção contra a peroxidação lipídica causada por EROS formados durante a resposta inflamatória ou mesmo gerados durante as atividades metabólicas normais das células ⁷³. Já foi demonstrado, em estudo prévio, que concentrações específicas de VC foram capazes de promover efeito protetor contra a agressão causada por agentes clareadores caseiros sobre cultura de células pulpares ⁴⁰.

A VE é composta por uma mistura de Tocoferóis e Tocotrienóis, sendo que ambos apresentam quatro isômeros (α , β , γ e δ) ¹. Porém, a ação antioxidante é mediada pelo isômero alfa-Tocoferol (α -T), o qual possui a capacidade de incorporar-se na membrana celular e impedir a propagação da peroxidação lipídica ⁶⁹. Alguns pesquisadores avaliaram o efeito protetor do α -T e verificaram sua capacidade de estabilizar a membrana celular, e assim impedir a propagação do estresse oxidativo, aumentando a viabilidade celular e a quantidade de antioxidantes endógenos ^{4,11,50,78}.

Diversos estudos sobre a ação do α -T têm sido desenvolvidos dentro da área médica devida sua ação coadjuvante no tratamento de algumas doenças, tais como aterosclerose, diabetes, mal de Alzheimer e câncer, pois impede, ou pelo menos reduz eventos oxidativos ^{10,22,35,43,48,49,61}. Recentemente, Makpol et al. ⁴⁵ (2010) relataram a eficiência do α -T contra a ação tóxica do PH, sendo que isto ocorre devido a capacidade do α -T em restaurar a atividade da telomerase e mediar sinalizações celulares. Na Odontologia, o tratamento de fibroblastos de gengiva humana com o isômero α -T hidrossolúvel foi capaz de reduzir significativamente a citotoxicidade de materiais dentários resinosos, demonstrando o seu efeito protetor ⁴⁴. Diante do exposto e frente aos dados científicos escassos que relacionam células pulpares, agentes antioxidantes e géis clareadores, foi estabelecida a hipótese de que a atividade antioxidante da VE, especificamente do isômero α -T,

pode ser capaz de proteger as células da polpa contra os efeitos oxidativos e tóxicos gerados pelo PH presente nos produtos clareadores.

Revisão da Literatura



Revisão da Literatura

1. Clareamento Dental

O clareamento dental é considerado um tratamento cosmético e não invasivo muito utilizado na Odontologia Estética. Entre a década de 50 e 80, várias substâncias foram utilizadas com o objetivo de clarear dentes não vitais escurecidos^{24,26}. Com o passar do tempo, a atenção acabou se voltando para os dentes vitais manchados. Em 1989, Haywood, Heymann³³ descreveram a técnica do clareamento caseiro. Esta técnica faz uso de agentes clareadores com baixas concentrações de peróxido de carbamida (PC: de 10 a 22%) ou peróxido de hidrogênio (PH: de 6 a 7,5%). A reação ocorre a partir da decomposição do PC em PH e uréia; este último, por sua vez, se decompõe em dióxido de carbono e amônia. Segundo Leonard et al.³⁸ (1994), a amônia é responsável por alterar o pH do produto, facilitando a dissociação do PH, conseqüentemente, aumentando a produção de radicais livres, os quais são responsáveis pela quebra das cadeias extensas de cromóforos. Assim, os radicais livres diminuem o tamanho das cadeias de cromóforos no interior do dente, permitindo maior passagem de luz através de suas estruturas, o que o torna mais claro⁶⁵.

A técnica do clareamento “caseiro” é considerada como simples, prática e de baixo custo. Este tipo de terapia deve ser executada com a supervisão do cirurgião dentista, o paciente aplica o gel clareador sobre os dentes através do uso de uma placa de acetato personalizada, sendo que estas aplicações podem ser mantidas de 1 a 3 semanas⁷². Outra técnica, realizada no consultório, é totalmente conduzida pelo cirurgião dentista, onde se utiliza um gel com elevada concentração de PH (15-38%) ou PC (35-40%). Devido ao uso de altas concentrações de PH, a técnica de clareamento de consultório requer aplicações por um tempo reduzido sobre o esmalte (3 sessões de 15 minutos), sendo o gel exposto ou não à luz halógena.

Polêmico no âmbito científico, o procedimento clínico “clareamento dental” é sugerido com cautela, principalmente devido às evidências de que o PH, o principal componente ativo dos géis clareadores, é capaz de penetrar pelos tecidos duros do elemento dental^{9,12,15,20,28,29} e promover danos no tecido pulpar^{18,23,37,39,57,60,63,68}.

1.1. Penetração do PH

Há aproximadamente 25 anos, Bowles, Ugwuneri ¹² (1987) demonstraram que o PH é capaz de atravessar a estrutura dental e penetrar na câmara pulpar, sendo que esta penetração aumenta com a aplicação de calor. Neste estudo, dentes humanos anteriores extraídos tiveram a polpa coronária removida e substituída por solução tampão de acetato. Em seguida, a face vestibular dos dentes foi exposta à solução de PH nas concentrações de 1, 10 e 30%, sendo estes dentes mantidos numa temperatura constante de 37°C por 15 minutos. No grupo controle, o esmalte dental foi exposto à água destilada. Paralelamente, dois outros grupos foram expostos ao agente com 10% de PH, sendo que um destes grupos foi mantido a 37°C e outro a 50°C para avaliar a influência do calor na penetração do PH. A quantificação do PH foi realizada por método colorimétrico baseado na reação do PH com a enzima peroxidase na presença do corante violeta leucocristal. Os valores de densidade óptica das soluções foram mensurados em espectrofotômetro, e posteriormente comparados com uma curva padrão de PH. Os maiores valores de penetração foram observados nas amostras tratadas com PH a 30% (25,4 µg), seguidos do PH a 10% (5,8 µg) e PH 1% (1,8 µg). Nas amostras tratadas com 10% de PH e calor, a quantidade de PH encontrada no interior da câmara foi equivalente àquela observada nas amostras tratadas com 30% de PH (25,5 µg). Os autores concluíram que a difusão trans-amelodentinária está diretamente relacionada com a concentração da solução e a temperatura aplicada sobre o produto.

No estudo realizado por Cooper et al. ²⁰, em 1992, foi avaliada a penetração de PH para o interior da câmara pulpar após o uso PC ou PH na composição dos géis clareadores. Para isto, dentes humanos anteriores extraídos tiveram suas raízes seccionadas e o tecido pulpar coronário extirpado, sendo substituído por uma solução tampão acetato. O dente foi submetido ao clareamento com gel à base de PC (10% ou 15%) ou à base de PH (5% ou 30%). Toda a coroa permaneceu exposta ao agente clareador a 37°C durante 15 minutos. A quantificação do PH seguiu a mesma metodologia do estudo anterior. A penetração de PH foi estatisticamente significativa, obtendo-se os seguintes valores: 3,3 µg para o PC a 10%; 4,8 µg para o PC a 15%; 10,4 µg para o PH a 5%; 40,4 µg para o PH a 30%. Os autores concluíram que a penetração de PH para o interior da câmara pulpar está

diretamente relacionada com a concentração desta molécula no gel clareador.

Com o objetivo de avaliar a influência da presença de restauração na superfície dental clareada na difusão de PH para a câmara pulpar, Gökay et al.²⁸, em 2000, realizaram um estudo em incisivos humanos extraídos, os quais foram restaurados ou não com diferentes materiais restauradores e submetidos ao clareamento, sendo realizada a quantificação do PH (peroxidase/violeta leucocristal). Os dentes em estudo foram submetidos à realização de cavidades padronizadas do tipo classe V na face vestibular, as quais foram restauradas com os seguintes materiais: resina composta (RC) (Charisma[®], Heraeus Kulzer Ltda., Germany), cimento de ionômero de vidro (CIV) reforçado por resina (Vitremer[®], 3M/ESPE, St. Paul, MN, USA) ou compômero (Dyract[®], De Trey Dentisply Konstanz, Germany). A câmara pulpar foi preenchida com solução tampão acetato, e a porção coronária do dente foi imersa por 30 minutos nas seguintes soluções clareadoras: 30% de PH, 35% de PC, 15% de PC e 10% de PC. Após este período, foi realizada a quantificação do PH. Os grupos controles foram constituídos por dentes restaurados e íntegros não clareados. A maior penetração de peróxido foi observada nos dentes restaurados e clareados com agentes clareadores com elevadas concentrações do componente ativo. Nos grupos clareados com PH a 30% e PC a 35%, houve diferença significativa entre os materiais restauradores, havendo maior penetração nos dentes restaurados com CIV e menor penetração para os dentes restaurados com RC. Não foi observada diferença estatística entre os materiais restauradores para os dentes clareados com PC a 10 ou 15%. Desta forma, segundo os autores, a penetração do PH dependeu do tipo de material restaurador utilizado na superfície a ser clareada, porém independente do material todos os dentes restaurados mostraram maior penetração quando comparado ao controle (sem restauração).

Com proposta semelhante, Benetti et al.⁹ (2004) avaliaram a influência da presença de restauração de RC na superfície dental submetida ao clareamento, na penetração de PH em direção à câmara pulpar. Foram realizadas cavidades padronizadas tipo classe V na superfície vestibular de incisivos laterais bovinos, a qual foi restaurada com resina composta (Durafill[®]; Heraeus Kulzer GmbH, Germany). A polpa coronária dos dentes foi substituída por solução tampão acetato. Em seguida, géis clareadores contendo 10% (Opalescence[®], Ultradent, South

Jordan, UT, USA) ou 35% de PC (Opalescence Quick[®], Ultradent, USA) foram aplicados na superfície vestibular dos dentes por 60 minutos. Os grupos controles foram constituídos por dentes íntegros e restaurados que permaneceram em contato com água destilada pelo mesmo período de tempo. Foi observada penetração significativa de PH para os dentes restaurados em comparação com os dentes íntegros, a qual foi significativamente maior nos grupos clareados com PC a 35% em relação aos grupos submetidos ao gel com PC a 10%. A concentração de PH encontrada foi de 0,7879 µg para dentes restaurados + PC 35%, 0,2954 µg para dentes restaurados + PC 10%, 0,131 µg para dentes íntegros + PC 35% e 0,0712 µg para dentes íntegros + PC a 10%. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os dentes íntegros clareados com PC a 10% e os controles. Portanto, em dentes restaurados há maior penetração de PH e isso está diretamente relacionado com a concentração de PH do gel clareador.

Gokay et al.²⁹ (2005) compararam a penetração de PH na câmara pulpar de diferentes produtos clareadores disponíveis diretamente ao consumidor. Os autores utilizaram incisivos centrais superiores humanos, os quais foram divididos em cinco grupos: G1 – fita clareadora com 5,3% de PH (Crest Whitestrips[®]; Protector e Gamble, Cincinnati - OH, USA); G2 – paint on (gel para pintar) com 19% de perborato de sódio (5,3% de PH) (Crest Night Effects[®]; Protector e Gamble, Mason - OH, USA); G3 – paint on com 18% de PC (6,5% de PH) (Colgate Simple White[®]; Colgate Palmolive New York, NY, USA); G4 – paint on com 8,7% de PH (Colgate Simple White Night[®]; Colgate Palmolive, New York, NY, USA); G5 – grupo controle (água destilada). Os produtos foram aplicados por 30 minutos na superfície de esmalte, sendo em seguida realizada a quantificação do PH que difundiu no tampão acetato por meio do teste violeta leucocristal/peroxidase. Foi observada diferença significativa para todos os grupos, obtendo-se as seguintes concentrações de PH: G1 – 0,726 µg; G2 - 0,175 µg; G3 - 0,231 µg; G4 - 0,433 µg. A maior penetração foi encontrada nos grupos cujo agente clareador era à base de PH (G1 e G4), enquanto que nos grupos onde o produto clareador era à base de PC ou perborato de sódio, obtiveram-se os menores valores de penetração de PH. Segundo os autores, a liberação lenta e gradual do PH em agentes clareadores contendo o PC ou o perborato de sódio como componente ativo pode prevenir a penetração desta

molécula na câmara pulpar.

No estudo realizado por Camargo et al.¹⁴ (2007), foi avaliado a penetração de PH na câmara pulpar de dentes humanos e bovinos com ou sem presença de restauração. Cavidades classe V foram preparadas na face vestibular dos dentes, as quais foram restauradas com RC (Esthetic X[®], Dentsply, Ballaigues, Switzerland), CIV (Vidrion R[®], SS White, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) ou CIV modificado com resina (Vitrem[®], 3M/ESPE Dental Products, St. Paul, MN, USA). Em seguida, o clareamento foi realizado com PH a 38% (Opalescence[®], Xtra Boost, Ultradent, South Jourdan, UT) por 40 minutos, sendo realizada a quantificação do PH que se difundiu para a câmara pulpar (teste violeta leucocristal/peroxidase). Os resultados demonstraram que ocorreu maior penetração de PH nos dentes humanos do que nos dentes bovinos para todos os grupos. Para os dentes humanos, todos os grupos restaurados diferiram de forma significativa do grupo controle, sendo que os maiores valores de penetração foram observados para os dentes restaurados com CIV modificado por resina. Nos dentes bovinos, diferença significativa foi observada apenas para os dentes restaurados com CIV modificado por resina. Segundo os autores, a maior penetração de PH nos dentes humanos pode ser devido à menor espessura de esmalte e dentina em comparação aos dentes bovinos.

A associação da luz no clareamento dental tem sido bastante indicada na atualidade. No entanto, ainda existem controvérsias na literatura quanto à eficácia e segurança deste protocolo de clareamento. Desta forma, Camargo et al.¹⁵ (2009), avaliaram a influência da fotoativação do gel clareador na penetração de PH para a câmara pulpar. Incisivos laterais bovinos foram selecionados, sendo realizada a remoção da porção radicular e preenchimento da câmara pulpar com solução tampão acetato. O clareamento foi realizado com gel contendo 35% de PH (Whiteness HP[®], FGM, Joinville, SC, Brasil) associado ou não à fotoativação com LED ou Laser Nd:YAG. O gel foi aplicado na superfície vestibular do dente por 20 minutos e fotoativado por 3 minutos. No grupo sem fotoativação, o gel clareador foi aplicado durante 20 minutos. No grupo controle, nenhum clareamento foi realizado, permanecendo o esmalte em contato com água destilada. Em seguida, a solução tampão foi removida para a quantificação do PH difundido. Os autores observaram que ocorreu penetração significativamente maior de PH nos dentes clareados e

fotoativados com LED e Laser Nd:YAG (1,1310 µg e 2,260 µg, respectivamente) quando comparados ao grupo apenas clareado (0,150 µg). Não foi observada diferença significativa entre os dois tipos de fonte de luz utilizados. Os autores concluíram que a utilização de luz no clareamento dental pode aumentar a penetração de PH em direção à câmara pulpar.

1.2. PH: Citotoxicidade e Danos Pulpares

Diante da evidente capacidade de difusão do PH pelos tecidos duros do dente, a qual foi cientificamente comprovada, estudos tentam relacionar a penetração do PH com a indução de processos inflamatórios no tecido pulpar, o que consequentemente, pode ocasionar a sensibilidade pós-clareamento. Histologicamente, o processo inflamatório induzido pelo PH foi confirmado em 1981, por Seale et al.⁶⁰, os quais realizaram uma pesquisa em dentes de cães recém erupcionados com espessura de esmalte e dentina semelhante a de dentes anteriores humanos. Os dentes receberam aplicações de um gel com 35% de PH por 30 minutos. Como resultado, observou-se uma reação inflamatória aguda com deposição de matriz dentinária de modo isolado. Nos grupos que receberam o mesmo gel associado ao calor, ocorreu semelhante reação inflamatória, porém com alterações morfológicas em toda camada de odontoblastos.

Segundo a revisão de Markowitz⁴⁶ (2010), o processo inflamatório pulpar pode sensibilizar fibras nervosas aferentes A e C. A intensidade da sensibilização e ativação nervosa depende da concentração de PH no gel clareador. Desta maneira, muitos pesquisadores têm utilizado células odontoblastóides para avaliar a citotoxicidade de agentes clareadores e para tentar esclarecer os mecanismos envolvidos no processo de lesão e morte celular, bem como na reação inflamatória de origem pulpar.

Em 2009, Lima et al.³⁹ avaliaram a citotoxicidade do gel de PC (PC 10%, Whiteness[®], FGM, Joinville, SC, Brasil) sobre células odontoblastóides MDPC-23. Os autores observaram, através do teste de viabilidade celular (teste de MTT) e análise morfológica das células (MEV), que o contato direto do gel de PC (0,1%) com as células causou intenso efeito citopático, caracterizado pela morte de aproximadamente 77% das células. Foi observado, também, alterações morfológicas

nas células, como notável contração do citoplasma. Entretanto, a concentração de 0,0001% de PC reduziu o metabolismo celular em apenas 11%, com sutis alterações morfológicas nas células MDPC-23.

Alguns pesquisadores avaliaram a citotoxicidade trans-amelodentinária (indireta) de géis clareadores com elevadas concentrações de PH na sua composição. No ano de 2009, Coldebella et al.¹⁸ avaliaram a citotoxicidade trans-amelodentinária de um gel com 35 % de PH (Whiteness HP[®], FGM, Joinville, SC, Brasil) após 5 aplicações do gel, exposto ou não a luz halógena (G1 e G2, respectivamente) sobre o esmalte. No grupo controle (G3), nenhum produto foi aplicado sobre o esmalte (sem tratamento). Os extratos (meio de cultura + componentes do gel que se difundiram através do esmalte e dentina) foram aplicados sobre as células odontoblastóides por 24 horas. Após este período, o metabolismo, a dosagem de proteína total e a morfologia das células foram avaliadas. No teste de metabolismo celular foi observado uma redução de 62,09% e 61,83% nos grupos G1 e G2, respectivamente, sendo que estes valores foram estatisticamente significativos quando comparados com G3. A dosagem da proteína total diminuiu 93,13% e 91,80% nos grupos G1 e G2, respectivamente. Em G1 e G2, as células apresentavam significativas alterações morfológicas após o contato com os extratos. Portanto, depois de 5 aplicações, com ou sem associação à luz, produtos de degradação do gel clareador foram capazes de penetrar e se difundir pelo esmalte e dentina, causando consideráveis efeitos tóxicos sobre as células.

Com o objetivo de avaliar os efeitos citotóxicos dos géis clareadores com elevadas concentrações de PH, Trindade et al.⁶⁸ (2009) utilizaram discos de esmalte/dentina, com espessuras semelhantes àquela observada em dentes incisivos humanos. Os discos foram adaptados em câmaras pulpares artificiais (CPAs), sendo este conjunto disco/CPA, posicionados, individualmente, em placas de 24 compartimentos contendo meio de cultura em contato com a superfície dentinária. O gel clareador com 35% de PH (Whiteness HP[®], FGM, Joinville, SC, Brasil) foi aplicado na superfície de esmalte (3 sessões de 15 minutos) associado ou não à irradiação com luz halógena (430 mW/cm²) por 20 segundos. Após a última aplicação do gel clareador, as CPAs foram mantidas em incubadora a 37°C por 12 horas. Decorrido este período, o meio de cultura contendo os produtos de difusão

trans-amelodentinária do gel clareador, denominado de extrato, foi aplicado sobre as células de linhagem odontoblástica MDPC-23, as quais foram previamente cultivadas. No grupo controle, não foi realizado qualquer tratamento na superfície de esmalte do disco. O metabolismo celular foi avaliado pelo teste do MTT e a morfologia celular por meio da MEV. Os resultados demonstraram intensos efeitos citotóxicos sobre as células MDPC-23, sendo observado 92% de redução do metabolismo celular no grupo clareado e 82,5% para o grupo clareado e irradiado, não havendo diferença estatística entre esses dois grupos. A análise por MEV demonstrou que apenas um pequeno número de células com intensas alterações morfológicas permaneceram aderidas à lamínula de vidro. Restos de membrana de células mortas também foram observados. Portanto, este estudo *in vitro* demonstrou a intensa citotoxicidade do gel clareador com 35% de PH, independente deste produto ter sido ou não submetidos à irradiação com luz halógena.

No estudo realizado por Dias Ribeiro et al.²³ (2009), foi realizada a modificação da técnica de avaliação da citotoxicidade trans-amelodentinária proposta em pesquisas anteriores^{9,10}. Os autores adaptaram discos de esmalte/dentina em CPAs; no entanto, as células MDPC-23 foram cultivadas na superfície de dentina do disco, aproximando ainda mais o experimento da situação *in vivo*. Em seguida, o gel clareador com 35% de PH (Whiteness HP®, FGM, Joinville, SC, Brasil) foi aplicado na superfície de esmalte associando ou não à irradiação com luz halógena (500 mW/cm²). Os seguintes grupos experimentais foram estabelecidos de acordo com o tratamento da superfície de esmalte: G1 – duas aplicações de 15 minutos de gel clareador; G2 – duas aplicações de 15 minutos do gel associado a 20 segundos de irradiação com luz halógena; G3 – aplicação de luz halógena por 20 segundos; G4 – grupo controle (sem tratamento). Após incubação por 12 horas a 37°C e 5% de CO₂, foi realizada avaliação do metabolismo celular pelo teste do MTT. A análise da morfologia celular por MEV foi realizada na superfície dentinária dos discos de esmalte/dentina. Paralelamente, foi avaliada a alteração da temperatura na superfície dentinária após aplicação da luz. Os valores da redução do metabolismo celular para G1, G2 e G3 foram de 31,7%, 41,6% e 11,5%, respectivamente. Foi observada diferença significativa quando os grupos G1 e G2 foram comparados ao grupo controle. A associação entre o

clareamento e aplicação de luz resultou em maiores efeitos citotóxicos sobre as células; porém, esses resultados não foram estatisticamente significantes. A aplicação da luz, isoladamente sobre o esmalte, resultou em aumento da temperatura da superfície dentinária em 0,4°C, o que gerou em discreta redução do metabolismo celular, porém sem significância estatística. A MEV demonstrou em G1 e G2 um número reduzido de células aderidas ao substrato dentinário e a presença de fragmentos celulares, caracterizando a ocorrência de morte celular. As células que permaneceram aderidas à dentina apresentaram profundas alterações na morfologia. Segundo os autores, a aplicação de luz associada ao clareamento é questionável, pelo potencial de maiores danos às células pulpares.

Sacono et al.⁵⁷ (2010) avaliaram a citotoxicidade trans-amelodentinária de géis clareadores com 20 e 38% de PH sobre células odontoblastóides MDPC-23. Foram utilizadas CPAs, sendo o clareamento realizado na superfície de esmalte dos discos de esmalte/dentina conforme a recomendação do fabricante. O gel com 20% de PH (Whiteness HP Blue[®], FGM, Joinville, SC, Brasil) foi aplicado pelo período de 45 minutos, sendo realizada 1 ou 2 aplicações. Para o gel com 38% de PH (Opalescence, Xtra Boost, Ultradent, South Jordan, EUA), foram realizadas 1, 2 ou 3 aplicações de 10 minutos. Após a última aplicação dos produtos, as CPAs com os discos em posição, foram incubadas a 37°C por 12 horas para obtenção dos extratos, os quais foram aplicados sobre as células MDPC-23 em cultura. A viabilidade e morfologia celular foram avaliadas pelo teste do MTT e MEV, respectivamente. Foi observado intenso efeito citotóxico, com redução do metabolismo celular de aproximadamente 96% para todos os grupos, não havendo diferença significativa entre os grupos, independente do número de aplicações e da concentração do gel clareador.

Num estudo in vivo realizado por Kina et al.³⁷ (2010), foram avaliados os possíveis danos pulpares causados pelo gel clareador com 38% de PH (Opalescence, Xtra Boost, Ultradent, South Jordan, EUA) aplicado em pré-molares indicados para extração por motivos ortodônticos. Foi utilizada a técnica de clareamento de consultório, seguindo as recomendações do fabricante (3 aplicações de 10 min cada sobre o esmalte). As análises histopatológicas demonstraram ausência de dano celular no tecido pulpar. Porém, de Souza Costa et al.²¹ (2010)

observaram necrose em incisivos inferiores humanos quando da realização de 3 aplicações do gel de 15 minutos cada (Opalescence, Xtra Boost, Ultradent, South Jordan, EUA) sobre o esmalte. Os autores mostraram que o mesmo gel aplicado sobre o esmalte de pré-molares causou apenas discreta resposta inflamatória pulpar em alguns dentes. Esses dados sugerem que a espessura de esmalte e dentina pode influenciar na difusão do PH e conseqüentemente na intensidade dos danos pulpares.

Com o objetivo de avaliar o efeito tóxico trans-amelodentinário de géis clareadores com baixas concentrações de peróxido de carbamida, Soares et al.⁶³ (2011) utilizaram um gel clareador com 10% de PC (Whiteness Perfect[®], FGM, Joinville, SC, Brasil). O produto foi aplicado na superfície de esmalte por 8 horas diariamente, pelos períodos de 1, 7 ou 14 dias. Nos intervalos das aplicações do gel clareador, a superfície de esmalte permaneceu em contato com saliva artificial (16 horas). Para os grupos onde o gel foi aplicado por 7 ou 14 dias, o extrato obtido foi referente à última aplicação do gel clareador. No grupo controle, a superfície de esmalte foi mantida em contato com água deionizada por 14 dias. O extrato foi aplicado pelo período de 1 hora sobre as células MDPC-23 previamente cultivadas, sendo realizada avaliação do metabolismo celular pelo teste do MTT. Não foi observada diferença significativa entre o grupo controle e os grupos clareados. Nos grupos clareados por 1 e 7 dias, houve uma pequena tendência ao aumento do metabolismo celular (104%), sendo que apenas uma discreta redução foi observada para o grupo clareado por 14 dias (97,5%). O gel com 10% de PC não causou citotoxicidade trans-amelodentinário para a cultura de células MDPC-23. No entanto, a difusão de produtos do gel (PC 16%) resultou em efeitos citotóxicos sobre as células odontoblastóides mesmo após uma única aplicação deste produto em esmalte.

1.3. Minimizando danos pulpares

Mesmo diante dos testes de citotoxicidade diretos ou indiretos acima relatados, os experimentos não simulam, na íntegra, as situações clínicas, pois o complexo dentino-pulpar é dinâmico, de forma que essa característica pode ser responsável por minimizar alguns danos pulpares. Segundo Rapp et al.⁵⁵ (1992), o

complexo dentino-pulpar apresenta uma pressão positiva, a qual faz com que o fluido dentinário tenha tendência a exsudar do interior da polpa, o que pode diminuir a difusão de componentes tóxicos para a polpa.

Dentro do amplo mecanismo biológico do tecido pulpar e todas as células constituintes deste tecido conjuntivo especializado, tem sido reconhecida a existência de um sistema antioxidante que pode atuar na prevenção contra danos oxidativos gerados pelo PH. Em 1999, Anderson et al.² aplicaram um gel clareador com 10% de PC (Opalescence, Ultradent, South Jordan, UT) em pré-molares indicados para exodontia por motivos ortodônticos. Os autores observaram, em nível molecular, que o PC poderia induzir uma resposta pulpar contra o estresse oxidativo através do aumento da expressão de um marcador de estresse oxidativo, denominado Heme oxigenase 1. Existente em todas as células eucarióticas, esse marcador controla o equilíbrio celular, pois é a enzima responsável por desencadear a liberação endógena de produtos antioxidantes, como a catalase.

A catalase pode ser encontrada no tecido pulpar, tal como demonstrado no trabalho de Bowles e Burns¹² (1992), e posteriormente quantificado por Esposito et al.²⁵ (2003). Esse último estudo observou uma atividade significativamente maior da catalase no grupo com pulpíte reversível, em comparação aos grupos com polpa saudável ou pulpíte irreversível. Portanto, é comum ocorrer aumento na atividade da catalase em tecidos pulpares inflamados quando comparados aos tecidos saudáveis. O aumento da atividade da catalase está relacionado a um sistema de defesa ativo contra o PH, que é liberado durante processos inflamatórios. Além disso, uma hipótese de maior atividade enzimática presente na pulpíte reversível é suportada pela capacidade do tecido em recuperar-se, o que difere da pulpíte irreversível, visto que há uma redução da atividade da catalase. Essa redução é atribuída à progressão da inflamação, a qual pode acarretar na degradação desta enzima.

1.3.1. Antioxidantes na Odontologia

Com a finalidade de minimizar os danos oxidativos pulpares gerados por componentes de materiais dentários e pelo próprio PH, tem sido proposta a utilização de agentes antioxidantes no tratamento das células^{39,40,41,44,51,74}.

Em 2003, Majd et al.⁴⁴ avaliaram o efeito protetor de alguns antioxidantes, como o Trolox, análogo da vitamina E, especificamente do isômero α -Tocoferol, e do ascorbato de sódio contra os efeitos tóxicos de materiais odontológicos de origem resinosa. Para isto, células de linhagem fibroblástica oriunda de gengiva humana foram utilizadas para o cultivo celular. Os extratos obtidos dos materiais resinosos após 24 horas foram colocados em contato com as células e mantidos por mais 24 horas para posterior análise da viabilidade celular através do teste do MTT. Além disso, os autores quantificaram a presença de íons metálicos e de antioxidantes endógenos como a Glutathione. Observou-se que o ascorbato de sódio não apresentou efeito protetor em relação aos materiais que continham íons metálicos na sua composição. Porém, o α -T hidrossolúvel na concentração de 3 mM apresentou-se eficaz contra os efeitos tóxicos de materiais resinosos.

Yamada et al.⁷⁴ (2009) avaliaram o efeito antioxidante do N-acetil-cisteína contra produtos liberados de materiais dentários resinosos, os quais podem se difundir através dos túbulos dentinários para causar danos para as células da polpa. Foi determinado que o antioxidante derivado de aminoácido poderia eliminar a citotoxicidade do polimetil metacrilato (PMMA) oriundo de resinas sobre células odontoblastóides. O extrato de PMMA foi obtido e colocado em contato com as células submetidas ou não ao pré-tratamento por 1 hora com N-acetil-cisteína. Como resultado, as células pré-tratadas com o antioxidante mostrou-se com viabilidade de 45%, enquanto que as células sem tratamento mostrou-se com 20%. Além disso, aquelas células expostas apenas ao extrato mostraram forte tendência à apoptose, com níveis elevados de EROS e baixos índices de antioxidante endógeno (glutathione). Assim, a suplementação de N-acetil-cisteína pode recuperar a atividade celular, ou seja, células odontoblastóides pré-tratadas com este agente antioxidante foram protegidas contra os efeitos tóxicos da resina.

No ano seguinte, Oskoe et al.⁵¹ (2010) avaliaram o efeito do ascorbato de sódio 10% em dentes bovinos clareados. Um total de 69 blocos de esmalte bovino foram preparados e montados em resina acrílica. Após o polimento, os blocos foram divididos aleatoriamente em 3 grupos de 23 espécimes cada, sendo 3 destinados para análise em MEV e 20 para teste de dureza. No grupo G1, os espécimes foram imersos em água destilada (grupo controle) e no G2, os espécimes foram clareados com peróxido de carbamida 35% por 30 minutos por semana durante três semanas

consecutivas. No grupo G3, os espécimes foram expostos a 10% ascorbato de sódio durante 30 minutos. Após 3 semanas, a dureza dos espécimes foi mensurada em três pontos com distâncias iguais entre si e uma força de 50 g. A média dos valores de dureza para cada amostra foi calculada e os dados foram analisados pelo teste ANOVA ($P < 0,05$). O valor maior e o menor de microdureza foram observados no G1 e G2, respectivamente. No entanto, não houve diferença estatisticamente significativa na microdureza entre os grupos ($P = 0,12$). O uso de PC a 35% com ou sem 10% de ascorbato de sódio não afetou a dureza do esmalte bovino. Porém, foi sugerido que o uso do ascorbato de sódio na superfície do esmalte foi capaz de formar uma rede observada claramente em MEV. Deste modo, seria relevante o uso deste antioxidante com o objetivo de aumentar a dureza do esmalte após o procedimento clareador.

Em 2010, Lima et al.⁴⁰ avaliaram o efeito antioxidante do ascorbato de sódio (AS) contra os efeitos citotóxicos do PC a 0,01% (PC; 2,21 $\mu\text{g/ml H}_2\text{O}_2$) sobre cultura de células odontoblastóides MDPC-23. Os grupos foram G1: sem tratamento (controle), G2: 0,25 mM VC/60 minutos; G3: 0,5 mM VC/60 minutos; G4: 0,25 mM VC/60 min + 0,01% PC; G5: 0,5 mM VC/60 min + 0,01% PC e G6: 0,01% PC/60 min. As células, pré-tratadas por 1 hora com o AS, foram expostas ao extrato obtido com o gel de PC. O metabolismo celular foi avaliado por MTT e a morfologia celular em MEV. Foi demonstrado os efeitos citopáticos do PC sobre células MDPC-23, mesmo em baixas concentrações (0,01%). As células tratadas com PC apresentavam 66,88% de metabolismo quando comparado com grupo controle, o qual foi considerado como 100% de metabolismo. As células previamente tratadas com as concentrações de 0,25 mM e 0,5 mM de ascorbato de sódio apresentavam metabolismo de 90,35% e 97,63%, respectivamente. Desta forma, foi definida a capacidade do AS de proteger as células contra os efeitos citotóxicos do PC.

No mesmo ano, Lima et al.⁴¹ avaliaram a citotoxicidade trans-dentinária de géis clareadores com baixas concentrações de PC, bem como o efeito da aplicação prévia do antioxidante AS. Foram utilizados discos de dentina com 0,5 mm de espessura, com o objetivo de simular os efeitos tóxicos trans-dentinário do clareamento caseiro aplicado, clinicamente, em áreas cervicais de dentina exposta. Os discos de dentina, provenientes de molares humanos, foram testados quanto a

sua permeabilidade, o que permitiu sua distribuição homogênea entre os seguintes grupos: G1 – controle (sem tratamento); G2 – aplicação de AS a 10% por 6 horas; G3 – aplicação de gel com 10% de PC (Whiteness[®], FGM, Joinville, SC, Brasil) por 6 horas; G4 – aplicação de AS por 6 horas seguido do gel com 10% de PC por 6 horas; G5 – aplicação de gel com 16% de PC (Whiteness[®], FGM, Joinville, SC, Brasil) por 6 horas; G6 – aplicação de AS por 6 horas seguido do gel com 16% de PC por 6 horas. As células MDPC-23 foram semeadas na superfície pulpar dos discos, e imediatamente após a aplicação dos produtos na superfície oclusal foi realizada a avaliação do metabolismo celular (teste do MTT) e a morfologia celular (MEV). Paralelamente, foi realizada a quantificação do PH que se difundiu pela dentina após aplicação do PC a 10 ou 16% por 6 horas. A aplicação do PC a 16% isoladamente (G5) resultou em 65% de redução do metabolismo celular, a qual apresentou diferença significativa quando comparado ao grupo controle. Para os demais grupos, os valores do metabolismo celular não apresentaram diferença estatisticamente significativa com o controle. A aplicação do AS previamente ao clareamento (G4 e G6) reduziu os efeitos tóxicos, sugerindo a ocorrência de citoproteção devido à atividade antioxidante. Os maiores valores de penetração de PH foram observados para o grupo clareado com PC a 16%, sugerindo que a penetração do PH é proporcional à concentração do gel clareador com PC.

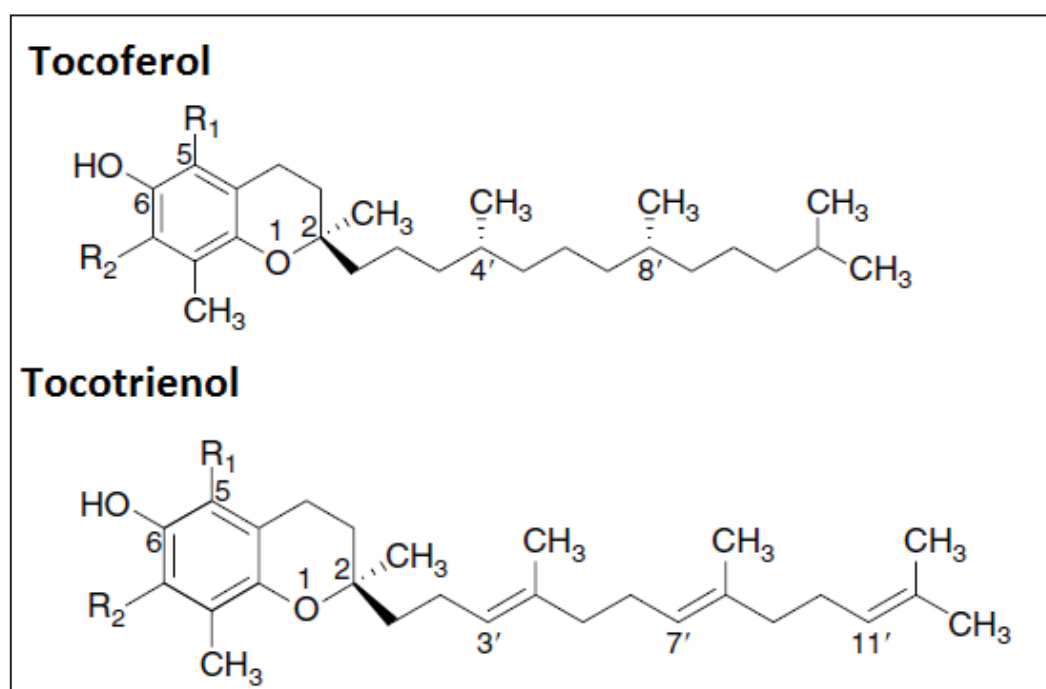
Diante do exposto o uso de antioxidantes pode minimizar os efeitos tóxico/oxidativos causados pelos componentes dos géis clareadores. A vitamina E (VE) tem sido amplamente pesquisada na área médica a fim de prevenir doenças causadas por reações oxidativas, como mal de Alzheimer⁴⁸, aterosclerose^{22,35,49} e câncer^{10,43,61}. A VE lipossolúvel é considerada um antioxidante bastante efetivo⁷¹ a qual está envolvida na proteção das células contra a peroxidação lipídica causada por EROS⁷³. A VE possui a capacidade de estabilizar a membrana celular, impedindo a propagação em cadeia do estresse oxidativo¹⁴. Porém, como são escassos os dados científicos que relacionam células pulpares, agentes antioxidantes e géis clareadores, uma revisão sobre suas características, sua ação e seus efeitos protetores será formulada a seguir com o intuito de ressaltar a importância que a VE pode ter para Odontologia.

2. Vitamina E (VE)

2.1. Características da VE

A VE é composta por Tocoferóis (T) e Tocotrienóis (TE), sendo que o último se difere do primeiro pela presença de insaturações ao longo de sua cadeia lateral (Figura 1). Estes componentes apresentam isômeros, os quais diferem-se pela disposição do grupo metil ao redor do anel benzoico, sendo denominados de alfa, beta, gama e delta. Tem sido demonstrado que o isômero que apresenta maior atividade biológica é o alfa-Tocoferol (α -T), considerado o componente majoritário da VE, e, por este motivo, a VE muitas vezes recebe a denominação genérica de α -T ⁷¹.

Figura 1- Estrutura química da Vitamina E é composta por Tocoferol e Tocotrienol, podendo ser diferenciadas pela instauração na cadeia lateral (Fonte adaptada de Mustacich DJ (2007) Journal: Vitamins and Hormones Series - VITAMIN HORMONE-ADVANCED RES APP, vol. 76, pp. 1-21).



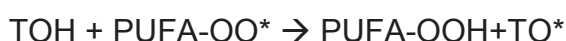
Azzi et al. ⁵, em 2001, afirmaram que a maioria dos T e TE, com a exceção do α -T, não são reciclados pelo organismo dos seres humanos. Isto sugere que o α -T, por possuir propriedades distintas e independentes, como ação antioxidante e pró-oxidante, age melhor que os outros isômeros na proteção celular. Esta proteção

pode ser atribuída à capacidade do α -T em incorporar-se à membrana celular. Azzi et al. ⁴, em 2000, isolaram uma proteína de ligação do α -T (TAP), considerada um membro de proteínas de ligação e relacionada à família hidrofóbica. A TAP está envolvida na regulação da concentração celular de α -T mediando a sinalização celular. Segundo Upadhyay e Misra ⁶⁹, em 2009, a TAP é capaz de ligar especificamente ao α -T, ajudando na absorção e distribuição do mesmo em organelas e tecidos, ou seja, é responsável por introduzir o α -T estruturalmente na membrana celular.

Na membrana, o α -T assume uma ação antioxidante, particularmente devido à sua capacidade de diminuir a permeabilidade da membrana celular, impedindo a propagação da peroxidação lipídica. Cheeseman et al. ¹⁶ (1995) avaliaram a biodisponibilidade do α -T a partir da administração oral, tanto da forma de acetato quanto de succinato de éster, em seres humanos saudáveis. As amostras de sangue foram retiradas periodicamente ao longo de 51 horas após a administração oral de drágeas (100 mg). Observou-se que a taxa de absorção foi semelhante de ambas formas, tanto a fenólica quanto a éster, pois os níveis plasmáticos máximos ocorreram em 12 horas, na maioria dos indivíduos. A concentração máxima de α -T incorporada na membrana de células vermelhas do sangue ocorreu entre 24 e 27 horas após sua administração.

2.2. Ação da VE na Membrana Celular

A ação antioxidante da VE é resultado da integração estrutural do α -T na membrana celular. Segundo Buettner ¹³ (1983), o α -T impede a propagação da peroxidação lipídica a fim de reparar os ácidos graxos poli-insaturados (PUFA) formando PUFA-OOH, assim como demonstrado na equação abaixo:



O α -T consegue reparar cerca de 90% dos PUFA-OO* produzidos, por isso sugere-se que a proporção de T e PUFA deve ser de aproximadamente 1:1000, ou seja, um T é capaz de proteger cerca de 1000 moléculas de PUFA. Esta proporção também pode ser observada na constituição da membrana celular, o que caracteriza sua ação estabilizadora.

Em 1987, Urano et al.⁷⁰ afirmaram que a estabilização da membrana pela VE pode ser atribuída, principalmente, à interação físico-química da porção cromanol do α -T com a fosfatidilcolina, um tipo de fosfolípido presente na membrana. Segundo a revisão de Atkinson et al.³, em 2008, esta "estabilização" se refere à estrutura e ao comportamento físico da bicamada lipídica da membrana celular, confirmando que o α -T ao se ligar aos ácidos graxos poli-insaturados presentes na membrana foi capaz de alterar qualitativamente a estrutura da mesma e, assim reduzir a permeabilidade da membrana. Deste modo, a VE é essencial para o mecanismo de defesa celular contra os oxidantes endógenos e exógenos impedindo a propagação da peroxidação lipídica, conseqüentemente, uma lesão na membrana.

2.2.1. Efeitos celulares da VE

Azzi⁶ (2004) sugeriu que o α -T por si só não é um agente antioxidante, pois apenas regula alguns antioxidantes endógenos, tais como catalase (CAT), glutathione (GSH) e superóxido dismutase (SOD). A depleção do gene da proteína transfer α -tocoferol (α -TTP), em ratos, foi capaz de induzir uma deficiência sistêmica do α -T e provocar disfunções neurológicas. Esta depleção também acarretou na baixa expressão de antioxidantes endógenos, tais como, superóxido dismutase, catalase, peroxidase e heme-oxygenase 1. Deste modo, sugere-se que a falta do α -T não causa estresse oxidativo, pois o α -T apenas regula o número de genes possivelmente envolvidos nas funções de proliferação celular e de transdução de sinais. A proteína responsável por distribuir o α -T no organismo, a TAP, ainda no fígado, é capaz de determinar o nível plasmático de α -T. Esta proteína possui afinidades diferentes para cada isômero da VE, sendo que o isômero α -T apresenta maior afinidade com essa proteína quando comparada aos demais isômeros (β -tocoferol, 38%; γ -tocoferol, 9%; δ -tocoferol, 2%; acetato de α -tocoferol, 2%; α -tocoferol quinona, 2%; SRR- α -tocoferol, 11%; α -tocotrienol, 12%; trolox, 9%). Ainda neste estudo os autores sugeriram que o α -T inibe CD36, um receptor para oxidação de LDL, deste modo, evita-se o acúmulo de placas de gorduras nos grandes vasos, prevenindo a aterosclerose.

Negis et al.⁵⁰ (2007) avaliaram o efeito do α -T em monócitos humanos e a efetividade do fosfato de α -T (α -TP) em relação a atividade do α -T. As células foram incubadas por 24 horas nas concentrações de 10, 25 e 50 e 100 μ M de α -T. Após este período, observou-se menor citotoxicidade celular para todas as concentrações testadas e semelhança entre os dois compostos testados. Azzi⁵, em 2007, discutiu, em uma revisão de literatura, o mecanismo de ação molecular do α -T, afirmando que a relação do α -T no ambiente oxidativo é de um sensor. Essa sensibilidade para monitorar o ambiente ocorre por meio de alterações de concentração. Deste modo, qualquer aumento ou diminuição da concentração de α -T é informado à célula. Assim, se inicia os fenômenos de reciclagem do α -T e distribuição por meio da TAP (proteína associada ao tocoferol).

Numa pesquisa recente, Zingg et al.⁷⁸ (2012) verificaram que a fosforilação do α -T resultou em fosfato de α -T, e este foi capaz de induzir um aumento na expressão de VEGF, ou seja, de estimular o fator de crescimento vascular endotelial, aumentando a angiogênese e a vascularização. Para isto, analisaram a gestação de ratas, com ou sem a suplementação com o α -T. Nas fêmeas não tratadas observou-se deficiência de passagem de nutrientes para o feto e menor quantidade de vasos sanguíneos. Já no grupo tratado, observou-se maior fluidez da membrana facilitando o transporte de nutrientes. Deste modo, os autores sugeriram que o fosfato de α -T foi capaz de promover uma maior vascularização placentária apresentando um papel importante na nutrição do feto.

2.3. Ação anti-inflamatória e antioxidante da VE

Em 2007, Devaraj et al.²² avaliaram o efeito da suplementação com α -T em pacientes com doença arterial coronariana (DAC) na prevenção da aterosclerose. Parte dos pacientes recebeu uma suplementação com α -T (1200 UI/dia) e outra parte recebeu uma suplementação placebo. Durante o período de 6 meses, observou-se no grupo suplementado que a concentração plasmática de α -T sempre foi superior em relação ao grupo placebo. Na avaliação por PCR, observou-se no grupo suplementado, uma redução nas concentrações de isopropanos, ânion superóxido e TNF. Portanto, os autores sugerem que a suplementação com α -T em

pacientes cardiopatas foi capaz de reduzir quantidades consideráveis de marcadores de estresse oxidativo e inflamação podendo prevenir a Aterosclerose.

No ano seguinte, Jiang et al.³⁶ (2008) afirmaram que a ação anti-inflamatória da VE se deve apenas a algumas isoformas da VE. A ação anti-inflamatória dos TE é superior aos T. A inibição da COX₁ e COX₂ ocorre de modo mais intenso quando administrado Gama-Tocotrienol. A partir do tratamento com α -T e/ou TE, tentou-se inibir a expressão de mediadores inflamatórios por células de linhagem A549 tratadas com sesamina. A sesamina foi utilizada a fim de comprovar a ação anti-inflamatória da VE. Na presença da sesamina, observou-se diminuição na inibição de COX₁ e COX₂, diferente do grupo no qual não se usou este produto químico. Portanto, os autores sugeriram uma participação efetiva da VE na cascata inflamatória.

Shingu et al.⁶¹ (2010) avaliaram o efeito antioxidante e anti-inflamatório da VE frente a uma agressão com LPS em ratos e em macrófagos em cultura. Os níveis de proteína de alta mobilidade B1 (HMGB1), secretadas por macrófagos e monócitos como mediadores de citocinas de inflamação foram mensurados. A histopatologia hepática dos animais mostrou-se significativamente melhorada no grupo tratado com VE, quando comparado com o grupo LPS. Observou-se que a administração de LPS aumentou a expressão de HMGB1 e a secreção de óxido nítrico (NO); porém, no grupo tratado com VE, houve a diminuição da secreção destes mediadores. Portanto, os autores puderam demonstrar que a VE pode inibir a inflamação, apresentando-se como um agente anti-inflamatório sugerindo seu uso terapêutico.

Neste mesmo ano, Tahan et al.⁶⁶ (2010) induziram inflamação crônica em ratos para avaliação do efeito da administração intraperitoneal prévia de VE (30 IU/kg/d) durante 3 dias consecutivos. Os testes oxidativos demonstraram redução nos níveis de MDA, GSH e SOD no grupo tratado com VE confirmando efetividade como antioxidante. Além disso, o tratamento também foi capaz de reduzir a produção de IL-1 β , IL-6 e TNF- α no tecido do cólon dos ratos. Desta maneira, a VE mostrou um efeito anti-inflamatório potente por meio da limpeza de radicais livres e eliminação de citocinas que causam inflamação do cólon neste modelo de estudo.

De forma semelhante, Yurdakul et al.⁷⁷ (2010) induziram estresse oxidativo em ratos, após a administração prévia (3 h) de α -T (10 mg kg⁻¹) via intraperitoneal. Foi observado diminuição no nível da xantina oxidase (XO), uma enzima que gera

EROS, e de malondialdeído (MDA), a qual produz três carbonos dialdeído altamente reativos a partir de subprodutos da peroxidação de ácidos graxos e do metabolismo do ácido araquidônico. Deste modo, ao simular uma injúria frequentemente corriqueira em procedimentos como nefrectomia parcial e em transplante renal, pôde-se observar o efeito danoso causado pelos radicais livres gerados. Quando associado ao α -T, os efeitos oxidativos diminuíram significativamente, caracterizando a real atividade protetora do α -T.

Em 2010, Gallo et al.²⁷ avaliaram os efeitos de antioxidantes como VC, VE e N-acetilcisteína (NAC - concentração de 5 pM), quando aplicados isoladamente ou em combinação, pelo tempo de 24 horas, sobre cultura de células de origem placentária após exposição à nicotina por 6 horas. Concluiu-se que tanto a VC, quanto a VE e NAC foram capazes de diminuir os níveis de MDA gerados pela nicotina, além de diminuir GSH. Em relação ao teste de MTT, os grupos tratados com os antioxidantes isoladamente ou em combinação, demonstraram viabilidade celular estatisticamente igual ao grupo controle (sem contato com nicotina). Desta forma, os três antioxidantes foram eficientes contra espécies reativas de oxigênio induzida pela nicotina, o que sugere o uso da suplementação de VC e VE a fim de reforçar a resistência placentária contra a lesão oxidativa.

Ainda em 2010, Ryan Michael et al.⁵⁶ induziram estresse oxidativo em ratos através da repetição de exercícios. Os autores observaram um aumento de antioxidantes endógenos após a suplementação com VE e VC. Doses diárias de VE (Acetato de α -T – 30 mg/kg) e VC (2% do peso do animal) foram adicionadas à ração e à água por 7 dias antes da primeira sessão de exercícios. As frações de proteínas citoplasmáticas e nucleares foram obtidas a partir da maceração da tíbia para avaliar a concentração de PH, a atividade de catalase e do superóxido dismutase. Os autores observaram que os animais consumiram aproximadamente 127 mg/kg de VE e 85 mg/kg de VC por dia. Em relação à execução dos exercícios físicos, os animais jovens suplementados com as vitaminas obtiveram maior desempenho muscular, atenuando a concentração de PH local. Além disso, os animais jovens apresentaram maior redução de glutathiona que os animais idosos. A suplementação com VE e VC diminuíram as lesões oxidativas, reduzindo MDA e os danos nucleares, bem como aumentou a atividade da catalase e do SOD. Porém, de acordo com os dados obtidos neste estudo, seria necessário mais 1 semana de

suplementação para obter a saturação plasmática das vitaminas no organismo dos animais. De maneira geral, foi demonstrado que os antioxidantes testados nesta pesquisa parecem ser regulados por modificações pós-transcripcionais e podem ser afetados de acordo com a idade, o tipo de exercício e a dose de suplementação.

Santos et al.⁵⁹ (2011) avaliaram o efeito neuroprotetor da VE (200 mg/kg) frente ao estresse oxidativo gerado por convulsões induzidas por pilocarpina (400 mg/kg, ip). Após 24 horas, os testes foram realizados e observou-se que houve uma redução significativa em relação ao nível de peroxidação lipídica e o teor de nitrito, aumentando a atividade da Mn-SOD e da catalase durante as convulsões. Deste modo, comprovou-se a interferência da VE na diminuição de estresse oxidativo induzido por medicamentos.

Ainda em 2011, Yildiz et al.⁷⁵ determinaram o efeito antioxidante da VE sobre células do sangue contra a peroxidação lipídica na prevenção da adesão intraperitoneal em ratos. Esses animais foram submetidos à administração de salina (G1), VE 10 mg (G2) e 1% de Azul de metileno (G3) para posterior incisão abdominal e sutura, realizada com os animais devidamente anestesiados. Desta forma, removeram-se células peritoniais para posteriores testes hematológicos (Concentração sérica de VE, VA e VC) e bioquímicos (níveis séricos de MDA, NO e GSH). Como resultado, foi observado menor agregação no grupo que apresentou maior concentração sérica de VE. Observou-se que a VE foi capaz de diminuir o nível de MDA e NO e aumentar o nível de GSH, impedindo assim, o estresse oxidativo.

Chen et al.¹⁷ (2011) avaliaram a efetividade da VE na prevenção do câncer de pulmão causado pelo fumo passivo em camundongos. Para tanto, células de cultura primária embrionária de pulmão foram cultivadas para avaliar os efeitos citotóxicos do extrato do fumo de cigarro, assim como sua influência na sobrevivência das células, no ciclo celular, bem como na apoptose e dano ao DNA. As células expostas ao extrato de nicotina (200 ng/L) por 24, 48 e 72 horas foram tratadas com VE em diferentes concentrações (1 µmol/L, 25 µmol/L, 50 µmol/L, 100 µmol/L e 200 µmol/L) por 2 horas e então submetidas ao teste de MTT. Observou-se que o extrato de cigarro poderia inibir significativamente a sobrevivência das células de modo dose e tempo-dependente. Além disso, foi observada claramente a perturbação do ciclo celular pela diminuição da proporção de células na fase S e

G2/M e o aumento da porcentagem de células na fase G0/G1. Houve, também, mais de 40% de apoptose nas células causando relevantes danos ao DNA celular. Por outro lado, a suplementação com VE resultou em forte tendência em inibir ou reverter os efeitos citotóxicos do extrato sobre as células de pulmão de modo dose e tempo-dependente. Os autores sugeriram que o mecanismo pelo qual a VE age sobre as células seja através de uma via mitocondrial a partir do citocromo C, além de ativação da caspase.

Guney et al.³¹ (2011) combinaram α -T com selênio (SE), e observaram que essa associação pode potencializar a ação antioxidante dos mesmos. Este estudo in vivo demonstrou que o α -T reduziu o estresse oxidativo em ratas prenhas, prevenindo o desenvolvimento da diabetes durante a gestação. Os animais submetidos ao tratamento receberam 60 mg/kg de α -T e 1 mg/kg de selênio por dia dissolvido em etanol administrado intraperitonealmente. No vigésimo dia de gestação e tratamento dos animais, as células sanguíneas foram coletadas e submetidas aos testes de determinação de MDA, SOD e CAT. Verificou-se que a diabetes experimental aumentou a peroxidação lipídica em ratas prenhas. Portanto, sugere-se que o estresse oxidativo pode desencadear o desenvolvimento da diabetes. Simultaneamente, a co-administração de VE e SE foi capaz de proteger as células contra os danos oxidativos induzidos por STZ (Streptozocina), utilizada neste estudo para induzir diabetes. Assim, foi possível observar a supra-regulação de GSH-Px, SOD, e os níveis de CAT no plasma.

Em 2012, Yilmaz et al.⁷⁶ associaram VE com a VC e comprovaram o interessante sinergismo destes agentes, os quais foram capazes de aumentar o efeito protetor sobre células de origem cerebral contra aos efeitos tóxicos induzidos por Diazinon, um pesticida usado na agricultura que gera estresse oxidativo no cérebro. Doses de α -T (150 mg/kg) intramuscular e 200mg/kg de VC intraperitoneal foram administradas. Posteriormente, os animais foram expostos ao Diazinon por 30 minutos, então sacrificados e o cérebro removido para análise da atividade de marcadores oxidantes. Observou-se, no grupo tratado com as vitaminas, a diminuição nos níveis de MDA (marcador de peroxidação lipídica) e da atividade da catalase, sugerindo o seu consumo durante a limpeza dos radicais livres. Também, observou-se um pequeno aumento do SOD e GSH, sendo que apenas o SOD esse aumento foi significativo.

Numa revisão de literatura recente, Coombes, Fassett ¹⁹ (2012) relataram que agentes antioxidantes têm sido utilizados em terapias para diminuir o estresse oxidativo e reduzir o risco de Doença Cardiovascular (DCV) em pacientes que necessitam de hemodiálise (HD). A revisão sistemática foi realizada no banco de dados Medline, na qual foram encontrados 56 estudos que investigaram o efeito de terapia com antioxidantes, além de biomarcadores de estresse oxidativo. O α -T foi o antioxidante mais investigado, pois 20 dos estudos de um total de 25 artigos selecionados utilizaram α -T. E nestes artigos o α -T foi capaz de diminuir o estresse oxidativo, sendo clinicamente capaz de proteger pacientes com DCV secundária. Em relação às pesquisas que utilizaram a VC, em apenas 4 dos 11 estudos selecionados, os autores observaram menor efeito protetor da VC comparado com o α -T. Foi demonstrado, ainda, que o α -T na sua forma natural (lipossolúvel) apresentou os melhores resultados.

2.4. Efeito da VE frente ao PH

Ram, Hiebert ⁵⁴ (2004) compararam o efeito protetor do α -T sintético dissolvido em DMSO sobre cultura de células endoteliais aórticas expostas ao PH. Imediatamente após 24 horas de tratamento com α -T, as células foram colocadas por outras 24 horas em contato com meio de cultura contendo PH. Após este contato, as células foram submetidas ao teste do Trypan Blue, além de verificar a atividade da LDH (desidrogenase láctica – presente em grande quantidade no plasma de pacientes enfartados). O α -T sintético (0,1 até 1 mmol/L) dissolvido em DMSO apresentou efeito protetor, caracterizado pelo aumento da viabilidade celular e diminuição da atividade LDH. Quanto maior a concentração de α -T sintético aplicado sobre as células, menor se tornava a atividade de LDH e maior foi a viabilidade celular.

Mazlan et al. ⁴⁸ (2006) compararam o efeito protetor do T e do TE contra os efeitos tóxicos do PH sobre cultura primária de astrócitos (células de origem neural). O estresse oxidativo foi induzido a partir de 100 μ M de PH por 24 horas, sendo que os astrócitos foram pré-tratados por 1 hora com Tocoferol ou Tocotrienol. Através do Teste MTS e do Kit Elisa por fluorescência, pode-se observar apoptose celular, além de identificar a toxicidade do Tocotrienol quando em concentrações superiores a 200

μM , sendo que para baixas concentrações (100 μM) do mesmo observou-se efeito protetor e menor quantidade de células apoptóticas. Para o Tocoferol não foi verificada citotoxicidade em concentrações superiores a 750 μM , deste modo, mostrou-se grande similaridade na inibição da apoptose e proliferação celular em cultura de astrócitos.

Foi comprovado por Makpol et al. ⁴⁵ (2010), que o uso de $\alpha\text{-T}$ protege as células contra danos ao DNA. Fibroblastos de origem epidérmica de indivíduos jovens e idosos foram submetidos ao estresse oxidativo induzido pelo PH. A administração da VE ocorreu antes e/ou após a indução, sendo 10 μM para as células jovens e 40 μM para as células de indivíduos idosos por 24 horas. Observou-se que houve danos como o encurtamento dos telômeros dos fibroblastos no grupo não tratado indiferentemente do tipo celular, demonstrando um aumento do estresse oxidativo. O pré e pós-tratamento com $\alpha\text{-T}$ protegeu as células de indivíduos jovens e idosos. Porém, o grupo pós-tratamento com $\alpha\text{-T}$ não foi capaz de reverter a situação ou até mesmo atenuar a redução do comprimento dos telômeros e a perda da atividade da telomerase dos fibroblastos, ou seja, o pré-tratamento foi mais eficiente. Sugere-se que o alongamento do comprimento dos telômeros e a restauração da atividade da telomerase pelo $\alpha\text{-T}$ pode ser por meio de sinalização celular.

Proposição

The image features the word "Proposição" in a black serif font, centered in the lower half of the page. The background is white, with a decorative graphic in the bottom right corner consisting of several overlapping, curved lines in shades of green and yellow, resembling a stylized leaf or a modern logo element.

Proposição

Avaliar o possível efeito protetor “in vitro” da Vitamina E, especificamente do α -T, contra o efeito citotóxico direto causado pelo PH sobre células odontoblastóides MDPC-23 em cultura.

Objetivo específico

- Definir o tempo de pré-tratamento e a concentração do α -T capaz de promover efeito protetor em células odontoblastóides MDPC-23 contra a agressão direta causada pelo PH.

Material e Método



Material e Método

Cultura de células

Células odontoblastóides MDPC-23 foram cultivadas em meio de cultura (DMEM; Sigma Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB; Cultilab, Campinas, SP, Brasil) contendo 100 IU/mL de penicilina, 100 µg/mL de streptomina e 2 mmol/L de Glutamina (Gibco, Grand Island, NY, USA) em incubadora umidificada com 5% de CO₂ e 95% de ar a 37°C (Isotemp Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA). As células MDPC-23 foram cultivadas por 3 dias até obter-se o número de células suficiente para a realização do estudo.

IC-50 do PH e Análise do Metabolismo celular (Teste do MTT)

Inicialmente, a concentração de PH capaz de promover em média a redução de 50% do metabolismo celular (IC 50) foi determinada. O IC 50 é a concentração máxima inibitória, ou seja, concentração de peróxido de hidrogênio capaz de inibir o metabolismo celular pela metade. Deste modo, pode-se observar o possível efeito estimulador ou inibitório da Vitamina E. Para tal fim, as soluções contendo concentrações decrescentes de PH foram preparadas a partir da diluição de uma solução estoque contendo 35% de PH (Whiteness PH; FGM, Joinville, SC, Brasil), em DMEM isento de soro. Em seguida, as células MDPC-23 (1×10^5 células/cm²) foram semeadas em placas de 96 poços (Costar Corp, Cambridge, MA, USA), mantidas em incubadora umidificada com 5% de CO₂ e 95% de ar a 37°C durante 72 horas. Em seguida, o DMEM foi aspirado e 100 mL das soluções com diferentes concentrações PH (0,0045%; 0,009%; 0,018% e 0,035%) foram aplicadas sobre as células MDPC-23. Após 30 minutos de incubação com as soluções, o metabolismo das células foi avaliado pela demonstração da citoquímica da enzima desidrogenase succínica (SDH) utilizando o ensaio methyltetrazolium (MTT)^{8,68}. Assim, as soluções de PH foram aspiradas e substituídas por uma solução contendo 90 mL de DMEM e 10 µL de solução de MTT (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) a uma concentração de 5 mg/mL em PBS. As células foram mantidas nesta solução

durante 4 horas em uma incubadora umidificada contendo 5% de CO₂ e 95% de ar a 37°C. Após 4 horas, o meio de cultura com a solução de MTT foi aspirado e substituído por 100 uL de solução de isopropanol acidificado (HCl 0,04 N) por poço para dissolver os cristais de formazan resultantes da clivagem do anel do sal MTT pela enzima SDH presente nas mitocôndrias de células viáveis. O metabolismo das células foi avaliado por espectrofotometria como sendo proporcional à absorbância medida a 570 nm de comprimento de onda com uma placa de leitor de ELISA (Thermo Plate, Nanshan District, Shenzhen, Gandong, China). Os valores foram transformados em porcentagem e a solução controle (DMEM) foi considerada como 100% de metabolismo celular. A partir dos resultados obtidos, a concentração de 0,018% PH foi selecionada para avaliar o efeito protetor do α -T contra a toxicidade do PH. A Tabela 1 exibe os resultados para as outras concentrações de PH testadas. O IC-50 foi determinado por três experiências independentes (n=6).

Tabela 1- Resultados do metabolismo celular das células MDPC-23 expostas a diferentes concentrações de Peróxido de Hidrogênio (PH) para determinação do IC 50

PH (%)	Metabolismo celular (%)
0	100
0,0045% PH	72
0,009% PH	77
0,018% PH	41
0,035% PH	5

Avaliação do efeito protetor do α -T contra a toxicidade direta do PH

Diferentes concentrações de α -T foram preparadas para avaliar seu efeito protetor contra a toxicidade do PH. A partir de uma concentração de 10 mM de α -T diluído em DMEM com 0,5% de dimetil sulfóxido (DMSO), foram obtidas mais três soluções experimentais com concentrações de 1, 3 e 5 mM de α -T⁴⁴. Desta forma,

os grupos experimentais (n=6) foram formados de acordo com o tratamento das células MDPC-23, com diferentes concentrações de α -T, em diferentes tempos de pré-tratamento (1, 4, 8 e 24 horas) seguido por exposição ou não a uma solução de PH a 0,018% durante 30 minutos. Para avaliar a citotoxicidade do α -T, as soluções de concentrações 1, 3, 5 e 10 mM de α -T foram aplicadas durante os tempos propostos. Após os tempos de pré-tratamento, as células foram submetidas ao contato direto com a solução de PH na concentração determinada previamente pelo IC 50 (0,018% de PH) durante 30 minutos. Os grupos experimentais e controles encontram-se resumidos na Tabela 2. Após os tratamentos, o ensaio de MTT foi realizado para avaliar o metabolismo das células da mesma maneira como descrito previamente.

Tabela 2- Grupos determinados para avaliação do efeito protetor de diferentes concentrações do α -T em diferentes tempos de pré-tratamento frente a agressão direta do PH a 0,018%

Grupos	1h	4h	8h	24h
G1	DMEM+DMSO 0,5%	DMEM+DMSO 0,5%	DMEM+DMSO 0,5%	DMEM+DMSO 0,5%
G2	PH 0,018%	PH 0,018%	PH 0,018%	PH 0,018%
G3	1 mM α -T	1 mM α -T	1 mM α -T	1 mM α -T
G4	3 mM α -T	3 mM α -T	3 mM α -T	3 mM α -T
G5	5 mM α -T	5 mM α -T	5 mM α -T	5 mM α -T
G6	10 mM α -T	10 mM α -T	10 mM α -T	10 mM α -T
G7	1 mM α -T + PH	1 mM α -T + PH	1 mM α -T + PH	1 mM α -T + PH
G8	3 mM α -T + PH	3 mM α -T + PH	3 mM α -T + PH	3 mM α -T + PH
G9	5 mM α -T + PH	5 mM α -T + PH	5 mM α -T + PH	5 mM α -T + PH
G10	10 mM α -T + PH	10 mM α -T + PH	10 mM α -T + PH	10 mM α -T + PH

Análise estatística

Para avaliar a distribuição dos dados foi aplicado o teste Kolmogorov-Smirnov ($n > 50$), como os dados de metabolismo celular (SDH) não aderiram a curva de normalidade, testes não-paramétricos foram aplicados. Deste modo, utilizou-se o teste Kruskal-Wallis complementado pelo teste de Mann-Whitney. O nível de significância foi fixado em 5%, com uma hipótese nula de que a PH não produz efeitos tóxicos em células odontoblastóides e que α -T não é capaz de eliminar ou reduzir os efeitos oxidativos do agente clareador.

Resultado



Resultado

Os resultados de metabolismo celular para os grupos propostos estão demonstrados na Tabela 3 e 4 (ANEXO 1)

Tabela 3- Metabolismo (MTT assay) de células MDPC-23 em contato ou não com diferentes concentrações de alfa-tocoferol previamente a aplicação de peróxido de hidrogênio 0,018%.

Alfa-tocoferol	Grupos	PH*	Período			
			1 h	4 h	8 h	24 h
0	G1	Não	103 (100-103) ^{**a}	100 (95-105) ^a	100 (97-104) ^a	100 (97-106) ^a
	G2	Sim	34 (32-41) ^a	36 (33-45) ^a	37 (33-43) ^a	41 (37-47) ^a
		Sig.***	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
1 mM	G3	Não	92 (89-95) ^{ab}	96 (93-99) ^a	96 (92-102) ^a	84 (83-86) ^b
	G7	Sim	50 (48-54) ^b	53 (48-55) ^b	57 (50-65) ^b	126 (115-131) ^a
		Sig.	<0,001	<0,001	<0,001	0,005
3 mM	G4	Não	92 (86-94) ^b	85 (83-89) ^b	84 (80-91) ^b	112 (107-115) ^a
	G8	Sim	62 (58-70) ^b	80 (65-101) ^{ab}	64 (57-76) ^b	97 (95-108) ^a
		Sig.	<0,001	1,000	0,01	0,018
5 mM	G5	Não	91 (88-93) ^{ab}	88 (84-90) ^b	93 (86-103) ^{ab}	97 (92-102) ^a
	G9	Sim	65 (63-67) ^b	74 (67-88) ^a	64 (54-75) ^{ab}	67 (58-70) ^{ab}
		Sig.	<0,001	0,065	<0,001	<0,001
10 mM	G6	Não	84 (77-95) ^a	74 (65-86) ^a	88 (74-97) ^a	76 (59-82) ^a
	G10	Sim	82 (74-97) ^a	77 (70-82) ^a	73 (65-79) ^a	46 (43-51) ^b
		Sig.	0,603	0,525	0,028	<0,001

* Peróxido de hidrogênio 0,018% ** valores são mediana (percentil 25-percentil 75), n=12; *** valor de p (Mann-Whitney) que permite a comparação entre “não” e “sim” peróxido de hidrogênio para a mesma concentração de alfa-tocoferol e período; ^a letras permitem comparações nas linhas. Medianas identificadas com a mesma letra não diferem estatisticamente (Mann-Whitney, p>0,05).

Tabela 4- Metabolismo (MTT assay) de células MDPC-23 em contato ou não com diferentes concentrações de alfa-tocoferol previamente a aplicação de peróxido de hidrogênio 0,018%.

Período	PH*	Concentração de alfa-tocoferol				
		0	1 mM	3 mM	5 mM	10 mM
		G1/G2	G3/G7	G4/G8	G5/G9	G6/G10
1 h	Não	103 (100-103) ^{**a}	92 (89-95) ^{ab}	92 (86-94) ^{ab}	91 (88-93) ^{ab}	84 (77-95) ^b
	Sim	34 (32-41) ^c	50 (48-54) ^{bc}	62 (58-70) ^{ab}	65 (63-67) ^{ab}	82 (74-97) ^a
	Sig. ^{***}	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,603
4 h	Não	100 (93-105) ^a	95 (93-99) ^{ab}	85 (83-89) ^{bc}	88 (84-90) ^{bc}	74 (65-86) ^c
	Sim	36 (33-45) ^b	53 (48-55) ^b	80 (65-101) ^a	74 (67-88) ^a	77 (70-82) ^a
	Sig.	<0,001	<0,001	1,000	0,065	0,525
8 h	Não	100 (97-104) ^a	96 (92-102) ^{ab}	84 (80-91) ^b	93 (85-103) ^{ab}	88 (74-97) ^b
	Sim	37 (33-43) ^b	55 (50-65) ^a	64 (57-76) ^a	64 (54-75) ^a	73 (65-79) ^a
	Sig.	<0,001	<0,001	0,001	<0,001	0,028
24 h	Não	100 (97-105) ^a	84 (83-86) ^{bc}	112 (107-115) ^a	97 (92-102) ^{ab}	76 (59-82) ^c
	Sim	41 (37-47) ^b	126 (115-131) ^a	97 (95-108) ^a	67 (58-70) ^b	46 (43-51) ^b
	Sig.	<0,001	0,005	0,018	<0,001	<0,001

* Peróxido de hidrogênio 0,018%; ** valores são mediana (percentil 25-percentil 75), n=12; *** valor de p (Mann-Whitney) que permite a comparação entre sem e com peróxido de hidrogênio para a mesma concentração de alfa-tocoferol e período; ^a letras permitem comparações nas linhas. Medianas identificadas com a mesma letra não diferem estatisticamente (Mann-Whitney, p>0,05).

Na Tabela 3, pode-se observar qual o tempo necessário, em cada concentração de α -T, capaz de proteger as células odontoblastóides contra os efeitos tóxicos do PH (0,018%). Para a concentração de 1 mM, foi observado que o tempo de 24 h é o mais adequado para obter o efeito protetor, embora tenha ocorrido diferença estatística entre G3 (1 mM de α -T/24h) e G7 (1 mM de α -T/24h + PH) ($p>0,05$). Esta diferença foi positiva, pois neste tempo e concentração, houve um estímulo no metabolismo das células (G7). Para a concentração de 3 mM, não houve diferença estatística entre G4 (3 mM de α -T) e G8 (3 mM de α -T+PH) dentro dos tempos de 4, 8 e 24 h de pré-tratamento. Assim, observou-se um efeito protetor do α -T, na concentração de 3 mM, a partir de 4 h de tratamento das células em cultura.

Para a concentração de 5 mM, também foi observado efeito protetor no período de 4 h desde que não houve diferença significativa entre os grupos G5 (5 mM de α -T) e G9 (5 mM de α -T+PH). Para a concentração de 10 mM, observou-se semelhança estatística para os tempos de 1 e 4 h de tratamento ($p > 0,05$). Portanto, uma visão geral da Tabela 3 permite sugerir que quanto maior o tempo de contato do α -T com as células, menor é a concentração necessária capaz de promover efeito protetor. O inverso também ocorre, ou seja, quanto maior a concentração do α -T, menor é o tempo necessário para obter o mesmo padrão de proteção celular contra os efeitos tóxicos do peróxido de hidrogênio. Ainda dentro da Tabela 3, foi possível determinar que 10 mM de α -T aplicado por 24 h sobre as células odontoblastóides causou significativa redução no metabolismo celular ($p < 0,05$).

A Tabela 4 permite comparar o efeito das concentrações de α -T dentro de cada tempo de pré-tratamento das células em cultura. De uma forma geral, observou-se que a relação concentração/tempo de pré-tratamento, para obtenção de efeito protetor celular frente a toxicidade do PH, foi inversamente proporcional, ou seja, concentrações mais elevadas de α -T obtiveram melhores resultados para o menor tempo de pré-tratamento, enquanto baixas concentrações desta molécula promoveram efeito protetor após longo tempo de pré-tratamento. Para o tempo de 1 h, observou-se que a eficácia do α -T foi proporcional à concentração aplicada, ou seja, quanto maior a concentração, maior o efeito protetor. Apenas as concentrações de 3, 5 e 10 mM apresentaram diferença estatística em relação ao grupo controle negativo (PH), porém, quando as mesmas foram comparadas entre si, não foi observada diferença estatística significativa ($p > 0,05$). Apesar de ausência de diferença significativa, pode-se constatar que o maior valor de metabolismo celular foi observado para a concentração de 10 mM (82%) ($p > 0,05$). No tempo de 4 h de pré-tratamento, as concentrações de 3, 5 e 10 mM não apresentaram diferença estatisticamente significativa quando comparadas entre si ($p > 0,05$). Porém, todas as concentrações foram significativamente diferentes do grupo controle negativo (PH). Para 8 h de pré-tratamento, observou-se igualdade estatística entre todas as concentrações (1, 3, 5 e 10 mM) quando comparadas entre si ($p < 0,05$). Com 24 h de contato com as células, pode-se observar, de uma maneira geral, que quanto menor a concentração do α -T, melhor o efeito protetor. As concentrações de 1 e 3 mM apresentaram diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle

negativo ($p > 0,05$), sendo que a concentração de 1 mM promoveu estímulo celular, visto que o valor de metabolismo celular (126%) foi superior ao observado para o controle positivo (100%). Já para as concentrações de 5 e 10 mM, o metabolismo celular foi estatisticamente semelhante ao observado para o controle negativo ($p > 0,05$).

Discussão



Discussão

Ainda que muito utilizado nos consultórios odontológicos, o clareamento dentário tem sido relacionado a danos pulparez devido à capacidade do seu principal componente (PH) em se difundir pelos tecidos mineralizados do dente e atingir a polpa^{12,21,37,46}. Diante disso, diferentes terapias têm sido sugeridas com intuito de minimizar esses danos, tais como a administração prévia de um agente antioxidante a fim de reduzir o estresse oxidativo gerado pelo clareamento no tecido pulpar^{40,41}. O isômero da VE, o alfa-tocoferol (α -T), o qual apresenta comprovada atividade biológica como agente antioxidante⁶⁹, pode apresentar efeito protetor sobre as células odontoblastóides MDPC-23 contra possíveis danos oxidativos oriundos de agentes clareadores. Estas células de linhagem imortalizada apresentam fenótipo de odontoblastos³², os quais, em dentes de mamíferos, revestem internamente a dentina. Desta maneira, os odontoblastos são as primeiras células da polpa a entrar em contato com componentes de materiais dentários capazes de se difundir pelo esmalte e dentina³⁰. Diante deste fato, as células MDPC-23 têm sido amplamente utilizadas há mais de uma década para testes de citotoxicidade direta e indireta de materiais dentários ou de seus componentes isolados^{18,23,40,41,68}.

Tratar células odontoblastóides com o isômero α -T da VE previamente ao procedimento clareador, tem sido proposto devido às características inerentes deste agente antioxidante, o qual é um composto lipídico presente na composição da membrana celular e que apresenta funções extra e intracelulares^{49,13}. Devido à característica antioxidante da VE, a mesma tem sido associada a diversos tratamentos, tais como na aterosclerose, Mal de Alzheimer e até mesmo no tratamento do câncer a fim de impedir eventos oxidativos^{10,22,43}. A capacidade da VE de incorporar-se na membrana celular, de doar elétrons, promover apoptose em condições específicas, inibir citocinas e modular a expressão gênica, são características de grande interesse para área da saúde^{4,5,6,7}. A capacidade de incorporação do α -T na membrana celular facilita o equilíbrio funcional da célula³. Estudos relataram que a incorporação do α -T na membrana celular é capaz de diminuir sua permeabilidade, pois ao interagir com ácidos graxos poli-insaturados da

membrana celular, o α -T impede a propagação da peroxidação lipídica^{7,64}. Com relação ao clareamento dental, incorporação de α -T na membrana celular poderia prevenir o desencadeamento da peroxidação lipídica provocada pelos EROS que penetram através do esmalte e dentina e atingem o tecido pulpar¹³. Estudos comprovaram que a incorporação de α -T na membrana de células (Linfócito T) ocorre entre 24 e 27 horas⁵⁸, sendo que para as células vermelhas esta incorporação já se apresenta completa no período de 24 horas¹⁶. Porém, não há dados sobre a incorporação de α -T na membrana de células pulpares, tal como odontoblastos. Assim, tornou-se pertinente avaliar, no presente estudo, diferentes tempos de pré-tratamento de células odontoblastóides MDPC-23 com α -T e seu efeito protetor contra o PH.

Já foi demonstrado, em estudos prévios, que outro antioxidante (vitamina C), quando em contato com células odontoblastóides MDPC-23 por 1 hora, foi capaz de reduzir o efeito tóxico do peróxido de carbamida⁴⁰. Em outro estudo, Majd et al.⁴⁴ (2003) avaliaram a ação do α -T hidrossolúvel na concentração de 3 mM, o qual foi mantido em contato com cultura de fibroblastos de gengiva humana por 24 horas. Os autores obtiveram resultados interessantes e animadores, pois o agente oxidante protegeu as células contra danos oxidativos oriundos de componentes de materiais dentários resinosos. O uso de antioxidantes na Odontologia tem se mostrado uma realidade promissora. Sendo assim, tornou-se pertinente, neste estudo, avaliar quais concentrações de α -T (1, 3, 5 e 10 mM) associadas a variados tempos de pré-tratamento (1, 4, 8 e 24 horas) de células MDPC-23, podem prevenir, ou pelo menos reduzir, os efeitos tóxicos do PH sobre este tipo celular.

Diante dos resultados do presente estudo, foi possível determinar o efeito protetor do α -T para todos os tempos de pré-tratamento e em todas as concentrações testadas, quando comparado ao grupo controle negativo (PH). De maneira geral, observou-se, para o grupo onde as células foram expostas apenas ao PH (G2), a persistência de 41% do metabolismo celular. Esse efeito tóxico do PH corrobora com dados de estudos anteriores, onde os autores demonstraram a citotoxicidade trans-amelodentinária do PH em altas concentrações sobre células de linhagem odontoblástica^{18,23,68}. Por outro lado, foi observado, na presente pesquisa, que quando as células MDPC-23 foram submetidas ao pré-tratamento com diferentes concentrações de α -T e em seguida expostas ao PH, houve importante

redução dos efeitos tóxicos do produto sobre as células em cultura. Este dado confirmou a capacidade do α -T em proteger as células odontoblastóides MDPC-23 contra os efeitos oxidantes do PH. Além disso, foi demonstrado que quanto maior o tempo de contato das células com o α -T, menores são as concentrações necessárias para obter-se o efeito protetor. O inverso também foi verdadeiro, pois o menor tempo de contato requereu concentrações maiores do α -T para prover proteção celular.

Ainda diante dos dados científicos obtidos na presente pesquisa e baseado em estudos anteriores, pode-se inferir que a VE atua na membrana celular, doando elétrons e impedindo a propagação da peroxidação lipídica ao interagir com ácidos graxos-poliinsaturados da membrana⁷¹. Quando presente no interior das células, a VE pode potencializar seu efeito protetor ao desencadear uma cascata de sinalização intracelular de defesa. Para os tempos de 1, 4 e 8 horas de pré-tratamento das células MDPC-23 com todas as concentrações de α -T, observou-se um aumento significativo do metabolismo celular em relação às células submetidas à agressão com PH. Esse resultado sugere que a proteção causada pela VE foi resultante de uma reação extracelular, visto que para ocorrer a incorporação do α -T na membrana celular, o tempo de contato com as células deve ser em torno de 24 horas¹⁶.

Para as concentrações de 1 e 3 mM de α -T mantidas em contato com as células por 24 horas, observou-se um aumento significativo no metabolismo das células (126% e 97%, respectivamente) em relação ao grupo controle PH (41%). Para estes grupos, provavelmente o efeito antioxidante foi exacerbado devido a incorporação do α -T na membrana celular, o que reduziria a permeabilidade da membrana^{7,64}. Deste modo, pode-se inferir que um tempo mais prolongado de contato das células com a VE pode resultar em maior incorporação da mesma na membrana celular, com consequente aumento no metabolismo celular, o que protegeria as células MDPC-23 contra os danos oxidativos do PH. Tem sido sugerido que o α -T necessita de aproximadamente 24 a 27 horas para se incorporar a membrana celular quando administrado via oral^{7,58}. Isto corrobora com os resultados obtidos no presente estudo, onde se observou os melhores resultados de viabilidade celular sobre as células MDPC-23 pré-tratadas por 24 horas.

De acordo com dados da literatura, o tempo de 24 horas de pré-tratamento das células com VE é capaz de desencadear a defesa da própria célula^{36,66,77}. Dentro deste contexto, é possível ocorrer um sinergismo do efeito extracelular e intracelular¹⁶, pois estudos sugerem que o α -T pode influenciar na sinalização intracelular e expressão gênica, mediando o estresse oxidativo e processos inflamatórios⁷⁸. Já foi observado que o α -T é capaz de diminuir níveis de IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-4 e IL-8^{36,66,73}, sendo comprovado cientificamente por Jiang et al.³⁶ (2008) a sua participação efetiva na cascata inflamatória. Além disso, o α -T foi capaz de promover efeito protetor em diferentes tipos celulares, como astrócitos, células de origem placentária, fibroblastos e hepatócitos, de modo a aumentar a viabilidade celular frente a um estresse oxidativo induzido^{27,45,48,54,77}. Ainda a partir de estudos in vivo, onde animais foram suplementados com α -T e submetidos ao estresse oxidativo, pode-se confirmar a interferência deste isômero da vitamina E no aumento da expressão de antioxidantes endógenos, como SOD, SDH e CAT^{17,31,56,59,66,76} comprovando a ação coadjuvante na sinalização intracelular, combatendo o estresse oxidativo e justificando o aumento da viabilidade⁶. Porém, observou-se uma queda significativa do metabolismo celular quando o α -T (10 mM) para todos os tempos de pré-tratamento avaliados no presente estudo, o que sugere que o α -T em altas concentrações em contato com as células pode ser tóxico, como observado em outros estudos¹⁰. Assim, a utilização de baixas concentrações, tais como 1 mM, aplicado por um longo período parece ser a alternativa mais interessante para se otimizar os efeitos benéficos do α -T.

Os dados científicos originais obtidos na presente pesquisa quanto ao efeito protetor do α -T sobre células odontoblastóides sugere que a administração deste isômero da VE previamente ao procedimento clareador pode ser importante para minimizar os danos oxidativos na polpa. Dessa forma, o potencial terapêutico da VE é amplo, sendo que a proposta de administrar esse composto vai além da sua ação antioxidante, capaz de inibir a peroxidação lipídica, pois também pode atuar como agente anti-inflamatório na polpa, minimizando outros efeitos colaterais negativos que podem ser causados pelo clareamento dental. Consequentemente, espera-se que estas importantes atividades da VE possam prevenir, ou pelo menos minimizar a sensibilidade pós-clareamento. Todavia, futuros estudos in vivo, particularmente avaliando a relação entre clareamento dental, sensibilidade pós-

operatória e administração de agentes antioxidantes, são necessários para confirmar os possíveis efeitos protetores de concentrações específicas de α -T sobre o tecido pulpar. Desta forma, a somatória de dados científicos obtidos de pesquisas in vitro e estudos clínicos poderão se complementar e consequentemente direcionar o desenvolvimento de técnicas de clareamento que promovam resultados estéticos satisfatórios, porém sem causar danos pulparem associados ou não a dor pós ou trans-operatória.

Conclusão

The image features a white background with a decorative graphic in the bottom right corner. This graphic consists of several overlapping, wavy lines in shades of green and yellow, creating a sense of movement and depth. The lines are thin and delicate, curving upwards and to the right.

Conclusão

De acordo com a metodologia usada na presente pesquisa “in vitro”, foi possível concluir que a Vitamina E, particularmente o isômero α -T, apresenta efeito protetor sobre as células MDPC-23 contra a ação tóxica causada pelo peróxido de hidrogênio. O pré-tratamento das células com as concentrações de 1 e 3 mM de α -T pelo tempo de 24 horas proporcionaram os melhores efeitos protetores para este tipo específico de células de origem pulpar.

Referências



Referências

1. Aggarwal BB, Sundaram C, Prasad S, Kannappan R. Tocotrienols, the vitamin E of the 21 st century: its potencial against cancer and other chronic diseases [Review]. *Biochem Pharmacol*. 2010; 80(11): 1613-31.
2. Anderson DG, Cheigo DJ Jr, GlickmanN, McCauley LK. A clinical assessment of the effects of 10% carbamide peroxide gel on human pulp tissue. *J Endod*. 1999; 25(4): 247-50.
3. Atkinson J, Epand RF, Epand RM. Tocopherols and tocotrienols in membranes: a critical review [Review]. *Free Radic Biol Med*. 2008; 44(5): 739-64.
4. Azzi A, Stocker A. Vitamin E: non-antioxidant roles [Review]. *Prog Lipid Res*. 2000; 39(3): 231-55.
5. Azzi A, Breyer I, Feher M, Ricciarelli R, Stocker A, Zimmer S, Zingg J. Nonantioxidant functions of alpha-tocopherol in smooth muscle cells [Review]. *J Nutr*. 2001; 131(2): 378-81..
6. Azzi A, Gysin R, Kempná P, Munteanu A, Negis Y, Villacorta L, Visarius T, Zingg JM. Vitamin E mediates cell signaling and regulation of gene expression [Review]. *Ann N Y Acad Sci*. 2004; 1031: 86-95.
7. Azzi A. Molecular mechanism of alpha-tocopherol action [Review]. *Free Radic Biol Med*. 2007; 43(1): 16-21.
8. Basso FG, Turrioni AP, Hebling J, de Souza Costa CA. Effects of zoledronic acid on odontoblast-like cells. *Arch Oral Biol*. 2012. [Epub ahead of print]
9. 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.
10. Birringer M, EyTina JH, Salvatore BA, Neuzil J. Vitamin E analogues as inducers of apoptosis: structure-function relation. *Br J Cancer*. 2003; 88(12): 1948-55.
11. Boscoboinik D, Szewczyk A, Hensey C, Azzi A. Inhibition of cell proliferation by alpha-tocopherol. Role of protein kinase C. *J Biol Chem*. 1991; 266(10): 6188-94.
12. Bowles WH, Ugweneri Z. Pulp chamber penetration by hydrogen peroxide following vital bleaching procedures. *J Endod*. 1987; 13(8): 375-7.

*De acordo com o manual da FOAr/UNESP, adaptadas das normas Vancouver.
Disponível no site: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

13. Buettner GR. The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, α -tocopherol and ascorbate. *Arch Biochem Biophys*. 1993; 300(2): 535-43.
14. 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 officebleach technique. *J Endod*. 2007; 33(9): 1074-7.
15. Camargo SE, Cardoso PE, Valera MC, de Araújo MA, Kojima AN. Penetration of 35% hydrogen peroxide into the pulp chamber in bovine teeth after LED or Nd:YAG laser activation. *Eur J Esthet Dent*. 2009; 4(1): 82-8.
16. Cheeseman KH, Holley AE, Kelly FJ, Wasil M, Hughes L, Burton G. Biokinetics in humans of RRR- α -tocopherol: the free phenol, acetate ester, and succinate ester forms of vitamin E. *Free Radic Biol Med*. 1995;19(5): 591-8.
17. Chen ZL, Tao J, Yang J, Yuan ZL, Liu XH, Jin M, Shen ZQ, et al. Vitamin E modulates cigarette smoke extract-induced cell apoptosis in mouse embryonic cells. *Int J Biol Sci*. 2011; 7(7): 927-36.
18. 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.
19. Coombes JS, Fassett RG. Antioxidant therapy in hemodialysis patients: a systematic review. *Kidney Int*. 2012; 81(3): 233-46.
20. Cooper JS, Bokmeyer TJ, Bowles WH. Penetration of the pulp chamber by carbamide peroxide bleaching agents. *J Endod*. 1992; 18(7): 315-7.
21. De Souza Costa CA, Riehl H, Kina JF, Sacono NT, Hebling J. Human pulp responses to in-office tooth bleaching. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2010; 109(4): 59-64.
22. Devaraj S, Tang R, Adams-Huet B, Harris A, Seenivasan T, de Lemos JA, Jialal I. Effect of high-dose α -tocopherol supplementation on biomarkers of oxidative stress and inflammation and carotid atherosclerosis in patients with coronary artery disease. *Am J Clin Nutr*. 2007; 86(5): 1392-8.
23. Dias Ribeiro AP, Sacono NT, Lessa FC, Nogueira I, Coldebella CR, Hebling J, et al. Cytotoxic effect of a 35% hydrogen peroxide bleaching gel on odontoblast-like MDPC-23 cells. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2009; 108(3): 458-64.
24. Dwinelle WW and Haywood VB. History, safety, and effectiveness of current bleaching techniques and applications of the nightguard vital bleaching technique. *Quintessence Int*. 1992; 23(7): 471-88.
25. Esposito P, Varvara G, Caputi S, Perinetti G. Catalase activity in human healthy and inflamed dental pulps. *Int Endod J*. 2003; 36(9): 599-603.

26. Fitch CP. Etiology of discoloration of teeth. *Dent Cosmos*. 1861; 3(3): 133-6.
27. Gallo C, Renzi P, Loizzo S, Loizzo A, Piacente S, Festa M, et al. Potential therapeutic effects of vitamin E and C on placental oxidative stress induced by nicotine: an in vitro evidence. *Open Biochem J*. 2010; 4: 77-82.
28. Gökay O, Yilmaz F, Akin S, Tunçbilek M, Ertan R. Penetration of the pulp chamber by bleaching in teeth restored with various restorative materials. *J Endod*. 2000; 26(2): 92-4
29. Gökay O, Müjdeci A, Algin E. In vitro peroxide penetration into the pulp chamber from newer bleaching products. *Int Endod J*. 2005; 38(8): 516-20.
30. Goldberg M, Smith AJ. Cells and extracellular matrices of dentin and pulp: a biological basis for repair and tissue engineering. *Crit Rev Oral Biol Med* 2004; 15(1): 13-27.
31. Guney M, Erdemoglu E, Mungan T. Selenium-vitamin E combination and melatonin modulates diabetes-induced blood oxidative damage and fetal outcomes in pregnant rats. *Biol Trace Elem Res*. 2011; 143(2): 1091-102.
32. Hanks CT, Sun ZL, Fang DN, Edwards CA, Wataha JC, Ritchie HH, et al. Cloned 3T6 cell line from CD-1 mouse fetal molar dental papillae. *Connect Tissue Res*. 1998; 37(3-4): 233-49.
33. Haywood VB, Heymann HO. Nightguard vital bleaching. *Quintessence Int*. 1989; 20(3): 173-6.
34. Jeng KC, Yang CS, Siu WY, Tsai YS, Liao WJ, Kuo JS. Supplementation with vitamins C and E enhances cytokine production by peripheral blood mononuclear cells in healthy adults. *Am J Clin Nutr*. 1996; 64(6): 960-5.
35. Jialal I, Fuller CJ. Effect of vitamin E, vitamin C and beta-carotene on LDL oxidation and atherosclerosis [Review]. *Can J Cardiol*. 1995; 11 Suppl G: 97G-103G.
36. Jiang Q, Yin X, Lill MA, Danielson ML, Freiser H, Huang J. Long-chain carboxychromanols, metabolites of vitamin E, are potent inhibitors of cyclooxygenases. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008; 105(51): 20464-9.
37. Kina JF, Huck C, Riehl H, Martinez TC, Sacono NT, Ribeiro AP, et al. Response of human pulps after professionally applied vital tooth bleaching. *Int Endod J*. 2010; 43(7): 572-80.
38. Leonard RH Jr, Bentley CD, Haywood VB. Salivary pH changes during 10% carbamide peroxide bleaching. *Quintessence Int*. 1994; 25(8): 547-50.

39. Lima AF, Lessa FC, Gasparoto Mancini MN, Hebling J, de Souza Costa CA, et al. Citotoxic effects of different concentrations of carbamide peroxide bleaching gel on odontoblast-like cells MDPC-23. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2009; 90(2): 907-12.
40. Lima AF, Lessa FC, Hebling J, de Souza Costa CA, Marchi GM. Protective effect of sodium ascorbate on MDPC-23 odontoblast-like cells exposed to a bleaching agent. *Eur J Dent.* 2010; 4(3): 238-44.
41. Lima AF, Lessa FC, Mancini MN, Hebling J, Costa CA, Marchi GM. Transdental protective role of sodium ascorbate against the cytopathic effects of H₂O₂ released from bleaching agents. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2010;109(4): 70-6.
42. Lu N, Chen W, Peng YY. Effects of glutathione, Trolox and desferrioxamine on hemoglobin-induced protein oxidative damage: anti-oxidant or prooxidant?. *Eur J Pharmacol.* 2011; 659(2-3): 95-101.
43. Maalouf S, El-Sabban M, Darwiche N, Gali-Muhtasib H. Protective effect of vitamin E on ultraviolet B light-induced damage in keratinocytes. *Mol Carcinog.* 2002; 34(3): 121-30.
44. Majd ES, Goldberg M, Stanislawski L. In vitro effects of ascorbate and Trolox on the biocompatibility of dental restorative materials. *Biomaterials.* 2003; 24(1): 3-9.
45. Makpol S, Zainuddin A, Rahim NA, Yusof YA, Ngah WZ. Alpha-tocopherol modulates hydrogen peroxide-induced DNA damage and telomerase shortening of human skin fibroblasts derived from differently aged individuals. *Planta Med.* 2010; 76(9): 869-75.
46. Markowitz K. Pretty painful: why does tooth bleaching hurt? *Med Hypotheses.* 2010; 74(5): 835-40.
47. Martindale JL, Holbrook NJ. Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival. *J Cell Physiol.* 2002; 192(1): 1-15.
48. Mazlan M, Sue Mian T, Mat Top G, Zurinah Wan Ngah W. Comparative effects of alpha-tocopherol and gamma-tocotrienol against hydrogen peroxide induced apoptosis on primary-cultured astrocytes. *J Neurol Sci.* 2006; 243(1-2): 5-12.
49. Munteanu A, Ricciarelli R, Zingg JM. HIV protease inhibitors-induced atherosclerosis: prevention by alpha-tocopherol. *IUBMB Life.* 2004; 56(10): 629-31.
50. Negis Y, Meydani M, Zingg JM, Azzi A. Molecular mechanism of alpha-tocopheryl-phosphate transport across the cell membrane. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007; 359(2): 348-53.

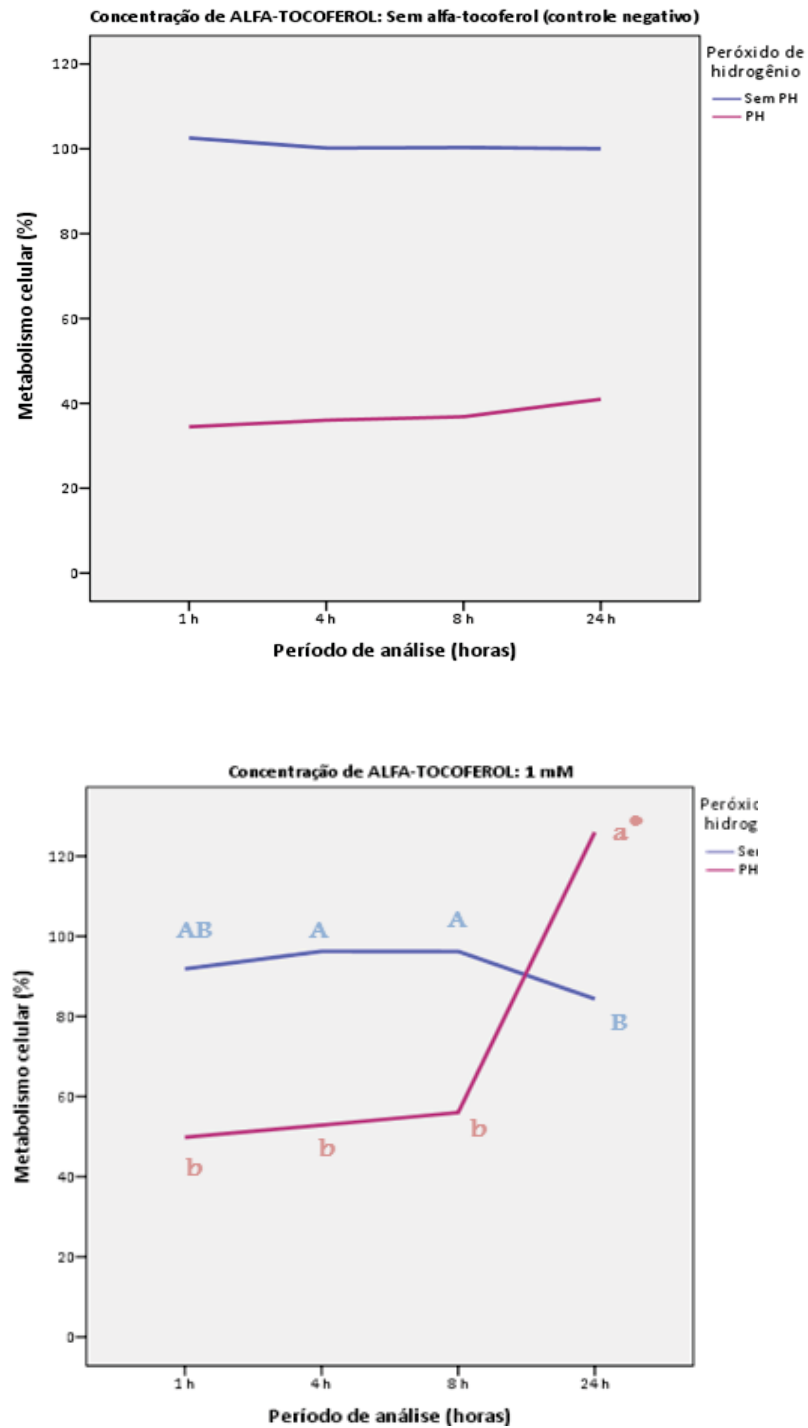
51. Oskoe PA, Navimipour EJ, Oskoe SS, Moosavi N. Effect of 10% sodium ascorbate on bleached bovine enamel morphology and microhardness. *Open Dent J*. 2010; 4(21): 207-10.
52. Pallast EG, Schouten EG, de Waart FG, Fonk HC, Doekes G, von Blomberg BM, Kok FJ. Effect of 50- and 100-mg vitamin E supplements on cellular immune function in noninstitutionalized elderly persons. *Am J Clin Nutr*. 1999; 69(6): 1273-81.
53. Pashley D, Okabe A, Parham P. The relationship between dentin microhardness and tubule density. *Endod Dent Traumatol*. 1985; 1(5): 176-9.
54. Ram JI, Hiebert LM. Vitamin E protects porcine but not bovine cultured aortic endothelial cells from oxygen-derived free radical injury due to hydrogen peroxide. *Cell Biol Toxicol*. 2004; 20(1): 55-67.
55. Rapp R, Matthews G, Simpson M, Pashley DH. In vitro permeability of furcation dentin in permanent teeth. *J Endod*. 1992; 18(9): 444-7.
56. Ryan MJ, Dudash HJ, Docherty M, Geronilla KB, Baker BA, Haff GG, et al. Vitamin E and C supplementation reduces oxidative stress, improves antioxidant enzymes and positive muscle work in chronically loaded muscles of aged rats. *Exp Gerontol*. 2010; 45(11): 882-95.
57. Sacono NT, Coldebella CR, Ribeiro APD, Soares DGS, Trindade FZ, Hebling J, et al. Efeito citotóxico de agentes clareadores a base de peróxido de hidrogênio a 20% e 38% sobre células odontoblastóides. *Rev Odontol Bras Central*. 2010; 18(19): 15-21.
58. Saito Y, Yoshida Y, Akazawa T, Takahashi K, Niki E. Cell death caused by selenium deficiency and protective effect of antioxidants. *J Biol Chem*. 2003; 278(41): 39428-34.
59. Santos PS, Costa JP, Tomé Ada R, Saldanha GB, de Souza GF, Feng D, et al. Oxidative stress in rat striatum after pilocarpine-induced seizures is diminished by alpha-tocopherol. *Eur J Pharmacol*. 2011; 668(41): 65-71.
60. Seale NS, McIntosh JE, Taylor AN. Pulpal reaction to bleaching of teeth in dogs. *J Dent Res*. 1981; 60(5): 948-53.
61. Shingu C, Hagiwara S, Iwasaka H, Matsumoto S, Koga H, Yokoi I, et al. EPCK1, a vitamin C and E analogue, reduces endotoxin-induced systemic inflammation in mice. *J Surg Res*. 2011; 171(2): 719-25.
62. Singh U, Devaraj S, Jialal I. Vitamin E, oxidative stress, and inflammation [Review]. *Annu Rev Nutr*. 2005; 25: 151-74.
63. Soares DGS, Ribeiro APD, Sacono NT, Coldebella CR, Hebling J, De Souza Costa, CA. Avaliação da citotoxicidade trans-amelodentinária de um gel de peróxido de carbamida a 10%. *Rev Assoc Paul Cir Dent*. 2010; 64(3): 55-8.

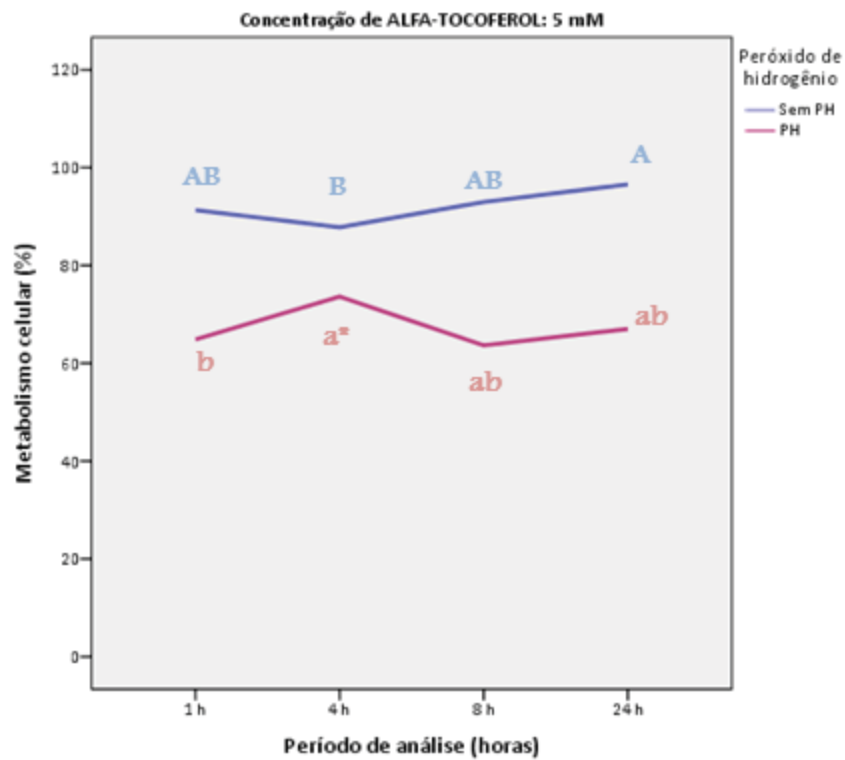
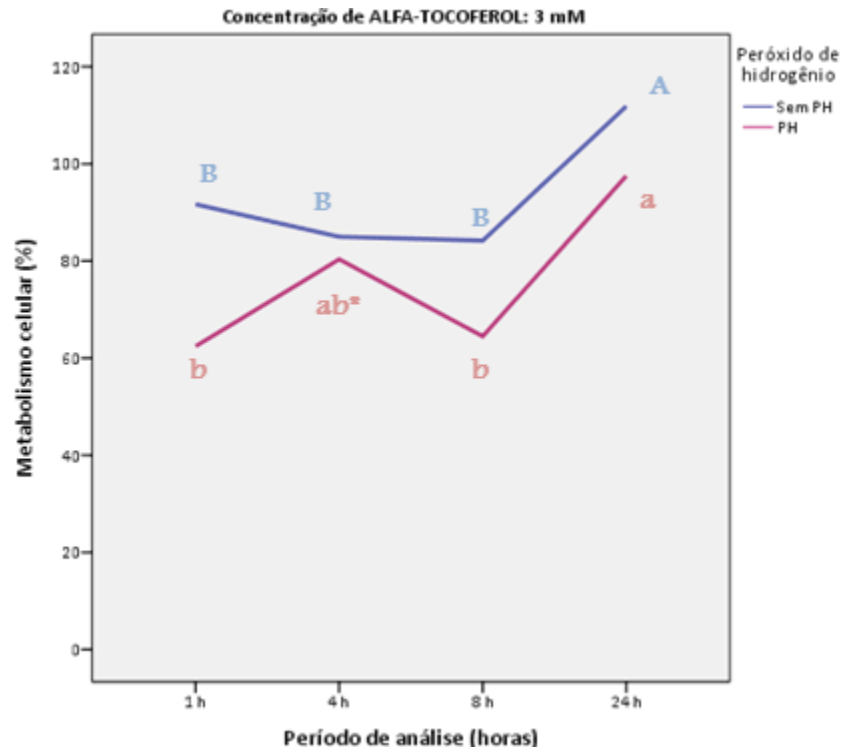
64. Sokol RJ, Heubi JE, Iannaccone S, Bove KE, Balistreri WF. Mechanism causing vitamin E deficiency during chronic childhood cholestasis. *Gastroenterology*. 1983; 85(5): 1172-82.
65. Sulieman MA. An overview of tooth-bleaching techniques: chemistry, safety and efficacy. *Periodontol 2000*. 2008; 48(1): 148-69.
66. Tahan G, Aytac E, Aytakin H, Gunduz F, Dogusoy G, Aydin S, et al. Vitamin E has dual effect of antiinflammatory and antioxidant activities in acetic acid-induced ulcerative colitis in rats. *Can J Surg*. 2011; 54(5): 333-8.
67. Tin-Oo MM, Saddki N, Hassan N. Factors influencing patient satisfaction with dental appearance and treatments they desire to improve aesthetics. *BMC Oral Health*. 2011 Feb 23; 11: 6. doi: 10.1186/1472-6831-11-6.
68. Trindade FZ, Ribeiro AP, Sacono NT, Oliveira CF, Lessa FC, Hebling J, Costa CA. Trans-enamel and trans-dentinal cytotoxic effects of a 35% H₂O₂ bleaching gel on cultured odontoblast cell lines after consecutive applications. *Int Endod J*. 2009; 42(6): 516-24.
69. Upadhyay J, Misra K. Towards the interaction mechanism of tocopherols and tocotrienols (vitamin E) with selected metabolizing enzymes. *Bioinformation*. 2009; 3(8): 326-31.
70. Urano S, Iida M, Otani I, Matsui M. Membrane stabilization of Vitamin E; interactions of alpha-tocopherol with phospholipids in bilayer liposomes. *Biochem Biophys Res Commun*. 1987; 146(3): 1413-8.
71. Wang X, Quinn PJ. Inverted hexagonal and cubic phases induced by alpha-tocopherol in fully hydrated dispersions of dilauroylphosphatidylethanolamine. *Biophys Chem*. 1999; 80(2): 93-101.
72. Wetter NU, Branco EP, Deana AM, Pelino JE. Color differences of canines and incisors in comparative long term clinical trial of three bleaching systems. *Lasers Med Sci*. 2009; 24(6): 941-7.
73. Wintergerst ES, Maggini S, Hornig DH. Contribution of selected vitamins and trace elements to immune function. *Ann Nutr Metab*. 2007; 51(4): 301-23.
74. Yamada M, Kojima N, Att W, Hori N, Suzuki T, Ogawa T. N-Acetyl cysteine restores viability and function of rat odontoblast-like cells impaired by polymethylmethacrylate dental resin extract. *Redox Rep*. 2009; 14(1): 13-22.
75. Yildiz H, Durmus AS, Simsek H. Surgery-induced changes in red blood cell and plasma lipid peroxidation, enzymatic and non-enzymatic, and blood hematology of female rats: protective role of methylene blue and vitamin E. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2011; 155(1): 89-93.
76. Yilmaz N, Yilmaz M, Altuntas I. Dioxin-induced brain toxicity and protection by vitamins E plus C. *Toxicol Ind Health*. 2012; 28(1): 51-7.

77. Yurdakul T, Kulaksizoglu H, Piskin MM, Avunduk MC, Ertemli E, Gokçe G, et al. Combination antioxidant effect of α -tocopherol and erdosteine in ischemia-reperfusion injury in rat model. *Int Urol Nephrol*. 2010; 42(3): 647-55.

ANEXO 1

Figura 1A- Metabolismo de células MDPC-23 (MTT assay) mantidas em contato com diferentes concentrações de alfa-tocoferol previamente a aplicação ou não de peróxido de hidrogênio (0,018%). O metabolismo celular foi avaliado 1 h, 4 h, 8 h e 24 h após a aplicação do PH. * Tempo de pré-tratamento que obteve efeito protetor





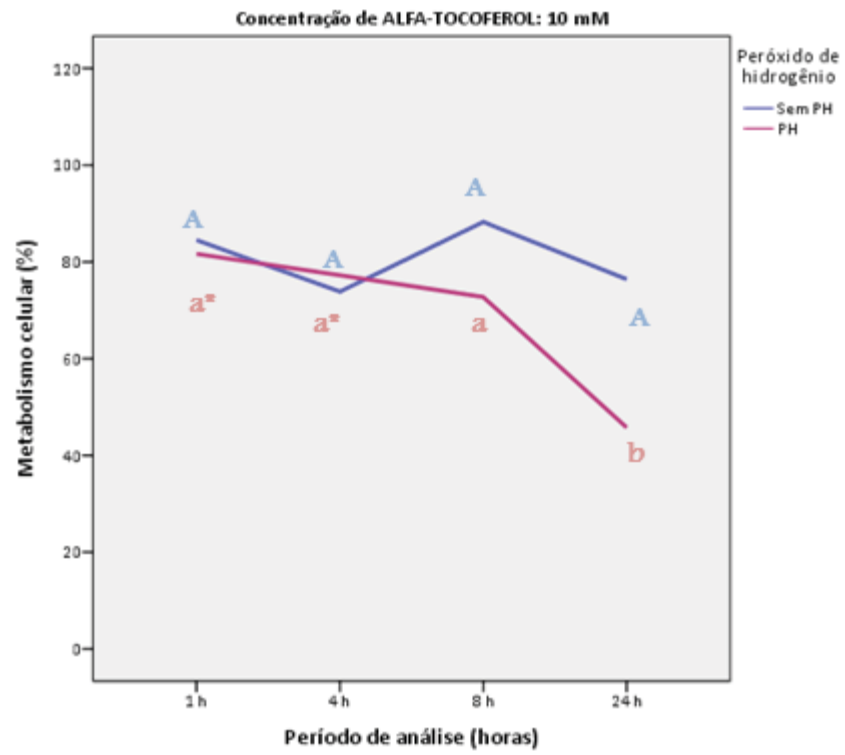


Figura 1B. Metabolismo de células MDPC-23 (MTT assay) nos diferentes **períodos de análise**, 1 h, 4 h e 24 h. Células foram mantidas em contato com diferentes concentrações de alfa-tocoferol previamente a aplicação ou não de peróxido de hidrogênio (0,018%). * Diferença significativa ($p < 0,05$) entre “Sem PH” e “PH”

