

MARINA MANSUR RAMAGEM

**INFLUÊNCIA DA FOTOPOLIMERIZAÇÃO COM APARELHOS LED NA INDUÇÃO  
DE ESTRESSE TÉRMICO SOBRE CULTURA DE CÉLULAS**

BRASÍLIA, 2018

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**MARINA MANSUR RAMAGEM**

**INFLUÊNCIA DA FOTOPOLIMERIZAÇÃO COM APARELHOS LED NA INDUÇÃO  
DE ESTRESSE TÉRMICO SOBRE CULTURA DE CÉLULAS**

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Paula Dias Ribeiro

Brasília

2018

MARINA MANSUR RAMAGEM

**INFLUÊNCIA DA FOTOPOLIMERIZAÇÃO COM APARELHOS LED NA INDUÇÃO  
DE ESTRESSE TÉRMICO SOBRE CULTURA DE CÉLULAS**

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Aprovado em 05 de março de 2018.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Profa. Dra. Ana Paula Dias Ribeiro (Presidente)

Universidade de Brasília - UnB

---

Prof. Dr. Laudimar Alves de Oliveira

Universidade de Brasília - UnB

---

Profa. Dra. Taia Maria Berto Rezende

Universidade de Brasília - UnB

*Dedico este trabalho aos meus professores pelos ensinamentos transferidos, aos colegas pelas contribuições e tempo dedicados a ajudar e, principalmente, aos meus pais pelo apoio e incentivo para a conclusão deste trabalho.*

## **AGRADECIMENTOS**

*A Deus por todos os desafios confiados, pelos aprendizados, pela paciência com minhas falhas e pela serena certeza que Ele sempre estará ao meu lado, protegendo e estimulando meu crescimento.*

*Aos meus pais e a minha irmã, que sempre me ofereceram o melhor do cuidado e do zelo e que através do esforço deles propiciaram que eu possuísse condições para adentrar ao mundo da pesquisa.*

*A Professora Ana Paula, compreensível e dedicada, que me ensinou os caminhos da pesquisa científica. Obrigada pelos conselhos e mesmo tão distante fisicamente, estar tão próxima, auxiliando e guiando nessas veredas da pesquisa.*

*Aos meus amigos que tiveram compreensão, acolheram nos momentos de dificuldade e sempre estiveram dispostos a ajudar.*

*Aos colegas e amigos de laboratório que participaram nas horas de acertos e de repetições.*

*Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília, pela oportunidade.*

*Ao Centro de Análises Proteômicas e Bioquímicas da Universidade Católica de Brasília, pelo acolhimento e estrutura.*

*À CAPES, CNPq, FAPDF, pelo auxílio financeiro.*

*Obrigada a todos que de bom coração estiveram ao meu lado nessa jornada!*

## RESUMO

Restaurações em dentes vitais envolvem cuidados operatórios para preservar a integridade pulpar, uma vez que a elevação da temperatura pulpar pode resultar em danos celulares. A síntese de *heat shock proteins* (HSP) é umas das formas de se avaliar a severidade do trauma sofrido pela polpa dental em consequência de um estresse térmico. Esta pesquisa avaliou *in vitro* danos celulares produzidos pelo estresse térmico gerado sobre a cultura de células macrófagos RAW 264.7 devido ao uso de fotopolimerizadores LED – Valo Led (Ultradent Products Inc) e Bluephase G2 (Ivoclar Vivadent Ltda.) – de alta irradiância. As células foram irradiadas com os LED diretamente sobre a base da placa de cultivo celular de 24 poços sem ou com interposição de dentina e resina gerando os seguintes grupos: G1 – grupo controle; G2 – Valo; G3 – Valo e dentina; G4 – Valo e dentina e resina; G5 – Bluephase; G6 – Bluephase e dentina; G7 – Bluephase e dentina e resina. Avaliou-se o metabolismo celular - pelo ensaio de MTT-, a produção de óxido nítrico (NO), a morfologia celular pela microscopia eletrônica de varredura (MEV) e análise da expressão gênica da HSP 70 pelo teste de *Polymerase Chain Reaction* em tempo real (PCR) de cada grupo. Os dados de MTT e NO foram avaliados pelos testes não-paramétricos (Kruskal-Wallis e Mann-Whitney) e os de PCR por testes paramétricos (ANOVA e Tukey). Resultados: os grupos G2 e G3 resultaram nos menores valores para metabolismo celular quando comparados com o G1 ( $p < 0.05$ ); os grupos G4, G6 e G7 apresentaram valores de metabolismo celulares estatisticamente superiores ao G1; a produção de óxido nítrico foi baixa para todos os grupos, porém o grupo G1 e o G7 apresentaram valores estatisticamente superiores aos demais grupos ( $p < 0.05$ ); os grupos G2, G3 e G5 apresentaram células com menor número de prolongamentos entre elas e presença de restos/fragmentos celulares evidenciando morte celular; os grupos G2 e G5 foram os únicos que apresentaram dados estatisticamente superiores quando comparado com o grupo G1 para a expressão gênica da proteína HSP 70. Os resultados sugerem que a irradiação com os LED induz vias de sinalização para reparar o tecido celular danificado. Contudo, estudos adicionais são necessários para melhor evidênciação dos resultados obtidos, visto que este é um estudo *in vitro*.

**Palavras-chave:** *Light-emitting diode*. Luz. Células Raw 264.7. Proteínas de choque térmico. HSP 70.

## ABSTRACT

Vital tooth restorations involve operative care to preserve pulp integrity, since raising the pulp temperature can result in cellular damage. The heat shock protein synthesis (HSP) is known as a way to evaluate the severity of the trauma suffered by the dental pulp as a result of thermal stress. The present study evaluated *in vitro* cell damage caused by thermal stress generated on RAW 264.7 cell culture due to the use of high irradiance LED - Valo Led (Ultradent Products Inc) and Bluephase G2 (Ivoclar Vivadent Ltda.). The cells were irradiated with the LED units directly on the base of the 24-well cell culture plate without or with dentin and/or resin interposition generating the following groups: G1 - control group; G2-Valo; G3 - Valo and dentin; G4 - Valo and dentin and resin; G5-Bluephase; G6 - Bluephase and dentin; G7 - Bluephase and dentin and resin. Samples from each group were used to evaluate cell metabolism by the MTT assay, nitric oxide (NO) production, cell morphology by scanning electron microscopy (SEM) and analysis of the gene expression of HSP 70 by the real time Polymerase Chain Reaction (PCR) test. MTT and NO data were evaluated by non-parametric (Kruskal-Wallis and Mann-Whitney) and RT-PCR data by parametric tests (ANOVA and Tukey). According to the results, it was possible to observe that the G2 and G3 groups resulted in the lowest values for cellular metabolism when compared to the G1 ( $p < 0.05$ ). The G4, G6 and G7 groups had statistically higher values of cellular metabolism than the G1. The production of nitric oxide was low for all groups, and the G1, as well as G7, presented statistically higher values than the other groups ( $p < 0.05$ ). In the analysis of the cell morphology, the G2, G3 and G5 groups presented cells with less number of extensions between them and presence of cell debris/fragments evidencing cell death. Analysis of the gene expression of HSP 70 demonstrated that the G2 and G5 groups were the only ones that presented statistically superior data when compared to the control group for the gene expression of the HSP 70 protein. The results suggest that the irradiation with the LED induce signaling pathways to repair damaged cell tissue. However, additional studies are needed to better demonstrate the results obtained, since this is an *in vitro* study.

**Keywords:** Light-emitting diode. Light. Raw cells 264.7. Heat-Shock Proteins

HSP 70

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1:** Foto ilustrativa do cultivo celular em garrafas plásticas.

**Figura 2:** Esquema ilustrativo de obtenção do disco de dentina com espessura inicial de 0,5mm.

**Figura 3:** Imagem ilustrativa da obtenção da espessura final de 0,4mm do disco de dentina. (A) Disco sendo lixado na face oclusal para obtenção da espessura final. (B) Mensuração da espessura final com paquímetro.

**Figura 4:** Demonstração do procedimento de fotopolimerização através da base da placa de cultivo celular de 24 poços.

**Figura 5:** Ilustração das placas de cultivo de 24 poços juntamente com os discos de dentina e resina e os aparelhos LED Valo e Bluephase.

**Figura 6:** Placa demonstrativa do teste colorimétrico de viabilidade celular MTT. A cor arroxeadada evidencia maior viabilidade, proporcional a produção de desidrogenase succínica.

**Figura 7:** Placa demonstrativa do teste colorimétrico de produção de Óxido Nítrico. As linhas A e B representam a curva padrão de colorimetria para referência dos valores de absorbância, durante a leitura, enquanto as linhas C, D, E, F, G e H de coloração clara demonstram que não foi evidenciada produção significativa de óxido nítrico no experimento realizado.

**Figura 8:** Gráfico do tipo box-plot com valores de absorbância em  $\mu\text{M}$  obtidos no ensaio de MTT, após 72h de incubação, para os diferentes grupos experimentais (G1 – grupo controle; G2 - irradiação com o Valo diretamente sobre as células; G3 - irradiação com o Valo com interposição de disco de dentina; G4 - irradiação com o Valo com interposição de disco de dentina e disco de resina; G5 - irradiação com o Bluephase diretamente sobre as células; G6 - irradiação com o Bluephase com interposição de disco de dentina; G7 - irradiação com o Bluephase com interposição de disco de dentina e disco de resina). As barras representam a mediana e a



distribuição dos valores de absorvância divididos em quartis após os testes de Kruskal-Wallis ( $p=0.0001$ ) e de Mann-Whitney.

**Figura 9:** Gráfico do tipo box-plot com valores de absorvância em  $\mu\text{M}$  obtidos no ensaio de ON, após 72h de incubação, para os diferentes grupos experimentais (G1 – grupo controle; G2 - irradiação com o Valo diretamente sobre as células; G3 - irradiação com o Valo com interposição de disco de dentina; G4 - irradiação com o Valo com interposição de disco de dentina e disco de resina; G5 - irradiação com o Bluephase diretamente sobre as células; G6 - irradiação com o Bluephase com interposição de disco de dentina; G7 - irradiação com o Bluephase com interposição de disco de dentina e disco de resina). As barras representam a mediana e a distribuição dos valores de absorvância divididos em quartis após os testes de Kruskal-Wallis ( $p=0.0000$ ) e de Mann-Whitney.

**Figura 10:** Imagens representativas do grupo controle - exposto apenas ao meio de cultura DMEM. Observa-se a não confluência da lamínula e a morfologia celular arredondada e com a presença de delgados filamentos citoplasmáticos. (A) aumento de 500X; (B) aumento de 1000X.

**Figura 11:** Imagens representativas dos grupos expostos a irradiação do aparelho Valo LED. As setas brancas indicam presença de restos/fragmentos celulares evidenciando morte celular e as setas amarelas indicam presença de mitoses. (A) (B) Grupo Valo 1 - aumento de 500X e aumento de 1000X, respectivamente; (C) (D) Grupo Valo 2 - aumento de 500X e aumento de 1000X, respectivamente; (E) (F) Grupo Valo 3 - aumento de 500X e aumento de 1000X, respectivamente.

**Figura 12:** Imagens representativas dos grupos expostos a irradiação ao aparelho Bluephase G2. As setas azuis apontam células com morfologia celular um pouco alterada, mais circular e com menor número de prolongamentos entre elas. Já as setas brancas indicam presença de restos/fragmentos celulares evidenciando morte celular e as setas amarelas indicam presença de mitoses. (A) (B) Grupo Bluephase 1 - aumento de 500X e aumento de 1000X, respectivamente; (C) (D) Grupo Bluephase 2 - aumento de 500X e aumento de 1000X, respectivamente; (E) (F) Grupo Bluephase 3 - aumento de 500X e aumento de 1000X, respectivamente.

**Figura 13:** O gráfico representa os dados expressos como a média  $\pm$  SEM de um experimento representativo de três experimentos independentes realizados em triplicata. \*  $p < 0,05$  versus grupo sem estímulo, one-way ANOVA e teste de *Tukey*. Valo 1 – irradiação diretamente sobre as células; Valo 2 – irradiação com interposição de disco de dentina; Valo 3 – irradiação com interposição de disco de dentina e disco de resina. Bluephase 1 – irradiação diretamente sobre as células; Bluephase 2 - irradiação com interposição de disco de dentina; Bluephase 3 - irradiação com interposição de disco de dentina e disco de resina.

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1** - Fotopolimerizadores testados, potência, tempo de fotopolimerização, densidade de energia

**Tabela 2** - Divisão dos grupos experimentais

**Tabela 3** - Sequência de oligonucleotídeos

**Tabela 4** - Valores da média e desvio-padrão assim como da mediana e distância interquartil dos valores em absorbância do teste de MTT

**Tabela 5** - Valores da média e desvio-padrão assim como da mediana e distância interquartil dos valores em absorbância do teste de NO

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

cDNA – ácido desoxirribonucleico complementar  
CO<sub>2</sub> – gás carbônico  
DMEM – Dulbeccos's Modified Eagle's Medium (Meio de cultura modificado  
Dubelco)  
DMSO: dimetilsulfóxido ou sulfóxido de dimetilo  
DNA – ácido desoxirribonucleico  
HSC - *Heat shock cognate*  
HSP – *Heat shock proteins* (proteínas de choque térmico)  
J/cm<sup>2</sup> – Joules por centímetro quadrado  
LED – *light emitting diode* (diodo emissor de luz)  
MEV- microscopia eletrônica de varredura  
mm – milímetro  
mL – mililitro  
mW/cm<sub>2</sub> - miliwatts por cm<sup>2</sup>  
MTT – metiltetrazolium  
n – amostras por grupo  
nm – nanômetros  
ON – óxido nítrico  
PBS – solução tampão fosfato  
PCR-RT – *Quantitative Polymerase Chain Reaction – real-time*  
pH – potencial hidrogeniônico  
QTH - halógenos de quartzo tungstênio  
RNA – ácido ribonucleico  
s – segundos  
SFB – soro fetal bovino  
UV – radiação ultravioleta  
µg/mL - micrograma por mililitro  
µg – micrograma  
µL - microlitro  
µm - micrômetro  
µM – micromol

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>14</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b>	<b>17</b>
2.1	ALTERAÇÕES TÉRMICAS	17
2.2	HEAT SHOCK PROTEIN	18
2.3	FOTOPOLIMERIZADORES LED	19
<b>3</b>	<b>OBJETIVO</b>	<b>21</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>22</b>
4.1	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	22
4.2	CULTIVO DAS CÉLULAS RAW 264.7	22
4.3	OBTENÇÃO DO DISCO DE DENTINA	23
4.4	PROCEDIMENTO DE FOTOPOLIMERIZAÇÃO	25
4.5	ANÁLISE DA VIABILIDADE CELULAR PELO ENSAIO DE MTT	27
4.6	ANÁLISE DA PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO	29
4.7	ANÁLISE DA MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA	30
4.8	ANÁLISE DE NÍVEL TRANSCRITO DE HSP 70	31
4.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA	32
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>33</b>
5.1	ENSAIO DO MTT	33
5.2	ENSAIO DE NO	34
5.3	MORFOLOGIA CELULAR (MEV)	36
5.4	NÍVEL TRANSCRITO DE HSP 70	41
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	<b>43</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO</b>	<b>49</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>50</b>
	<b>ANEXO A – DOCUMENTO DE APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA</b>	<b>55</b>

## 1 INTRODUÇÃO

As *Heat shock proteins* (HSP) foram descobertas pela primeira vez em 1962 (1). Elas são um conjunto de proteínas sintetizadas por células do organismo em resposta ao estresse celular (2). As expressas pelos mamíferos são classificadas em cinco famílias de acordo com o peso molecular, porém as HSPs mais estudadas são: HSP90, HSP70 (ou HSP72) e HSP27 (1).

Sabe-se que as HSPs mantêm a homeostase e são expressas fisiologicamente em resposta a vários tipos de estresses (3, 4). Ou seja, diversos estímulos induzem a síntese de HSPs, não somente estímulos térmicos (5). Porém, a alteração na expressão gênica celular que leva a síntese das HSPs é a característica mais marcante de resposta ao choque térmico (6). A síntese das HSPs pela polpa dental ocorre em resposta a tensões ambientais - dano ou estresse pulpar. Situações clínicas, como: lesões cariosas, preparo cavitário e outros estímulos químicos, físicos e mecânicos, nos quais a polpa é submetida, estimulam a expressão destas proteínas.

A HSP mais conhecida é a HSP70 e existem relatos de que ela está presente no cérebro (7), no coração (8) e na polpa dentária (9). Estas proteínas são encontradas na polpa durante uma série de condições estressantes incluindo: o desenvolvimento (9), a formação da dentina reparadora (10), o preparo da cavidade (11), após o reimplante dentário (12) e a movimentação ortodôntica (13).

O estresse térmico é um dos estresses mais severos para a polpa dentária durante os procedimentos restauradores (14). Ele modula a degradação de numerosas proteínas e sinaliza a apoptose (3). Por outro lado, segundo os autores Lindquist & Craig (1988), citados por Schlesinger (1990) (3), a resposta ao choque térmico é a reação de proteção celular para a variedade ambiental de estímulos patológicos. Porém, as HSPs são críticas para a sobrevivência celular e medeiam vários mecanismos de ação, incluindo a regulação da transcrição de fatores pró-inflamatórios. O grau de HSPs expressas pelas células pode estar relacionado com a severidade do trauma sofrido pela polpa, essas podem ser um importante marcador para avaliar a extensão do trauma pulpar em estudos experimentais (2).

As alterações na temperatura pulpar também podem induzir reações inflamatórias. Níveis elevados de alguns mediadores inflamatórios podem causar reações inflamatórias humorais ou celulares levando a necrose celular e, conseqüentemente, a sintomas clínicos e terapêuticos (15). Fatores pró-inflamatórios, como o TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , estimulam as vias da inflamação podendo levar a progressão da destruição tecidual (16). Além disso, estes dois mediadores podem desencadear a via de sinalização de outros mediadores inflamatórios, entre estes a da IL-6, uma das primeiras citocinas liberadas nos momentos iniciais da inflamação (17).

Sabe-se que o aparelho fotopolimerizador utilizado durante os procedimentos odontológicos é fator crucial para a geração de calor. A maioria dos fotopolimerizadores utilizados hoje são os aparelhos com tecnologia LED – *light emitting diode* – que apresentam muitas vantagens em comparação com outros tipos de fotopolimerizadores, tais como: gerar menos calor, maior resistência ao superaquecimento, vida útil longa e menores diâmetros de saída de luz (18).

Na tentativa de reduzir o tempo clínico e melhorar o grau de conversão dos monômeros resinosos, aparelhos fotopolimerizadores de alta potência de luz foram desenvolvidos. Alguns destes aparelhos alcançam a potência de 3000mw/cm<sup>2</sup> (19), como o Valo Led (Ultradent Products Inc). Porém, o aumento da intensidade de luz e o tempo de exposição são fatores de risco para o aumento da temperatura pulpar e conseqüentes danos térmicos (18). Além da alta intensidade de luz emitida, alguns destes fotopolimerizadores apresentam amplo espectro de comprimento de onda, por exemplo, o Valo Led – 395 - 480nm (19) – e o Bluephase G2 – 385 - 515 nm (20) –, a faixa destes comprimentos de onda coincide com os comprimentos de onda da luz ultravioleta (100 – 400 nm), o que parece ser preocupante, pois a radiação ultravioleta é danosa para as células do organismo. Além disso, muitos clínicos utilizam o modo de alta intensidade mantendo o tempo indicado pelo fabricante para fotopolimerização de cimentos, por exemplo, não levando em consideração a irradiância do aparelho e dose de energia necessária para fotopolimerização.

Visto que o calor excessivo, igual ou superior a 5,6 °C (21), pode gerar danos irreversíveis para a polpa dentária, desde a ressecamento da dentina até a necrose pulpar, esta pesquisa avaliou *in vitro* o estresse térmico gerado pelos fotopolimerizadores LED – Valo Led (Ultradent Products Inc) e Bluephase G2 (Ivoclar Vivadent Ltda.) – em cultura de células de macrófagos durante a

fotopolimerização. Mensurou-se o nível de estresse térmico gerado pela avaliação de alterações no metabolismo e na morfologia celular, da análise do estresse oxidativo, da expressão gênica de *Heat Shock Proteins 70* (HSP 70).



## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 ALTERAÇÕES TÉRMICAS

Diferentes procedimentos clínicos podem gerar efeitos térmicos no tecido pulpar. Tratamentos clínicos como laserterapia para sensibilidade dentinária, preparo cavitário utilizando laser ou com instrumentos de alta rotação, tratamentos restauradores utilizando aparelhos fotopolimerizadores são alguns exemplos de procedimentos clínicos que alteram a temperatura dentária (22–24). Durante a fotopolimerização de resinas compostas, a reação exotérmica e a absorção de energia durante a irradiação podem causar importante aumento de temperatura na câmara pulpar, que tem sido relatada variar de 2,9 a 7,8°C (25, 26).

A transferência de calor para a polpa dental é influenciada por inúmeros fatores, como a morfologia dental, tipo de material restaurador fotopolimerizável (cor, espessura, composição, porosidade), tempo de fotopolimerização, espessura remanescente de dentina, circulação pulpar e perfusão sanguínea (23, 24). O fluxo sanguíneo abundante na polpa também pode ajudar a dispersar o calor e ajudar a evitar danos pulpares devido ao aquecimento (27).

O comportamento térmico dos dentes é um processo de condução de calor, juntamente com os processos fisiológicos do dente (fluxo de fluido dentinário e fluxo sanguíneo pulpar). As propriedades termofísicas dos dentes variam entre diferentes camadas (esmalte e dentina) e dependem de suas microestruturas. A condutividade térmica da dentina humana diminui com a crescente fração de volume dos túbulos dentinários. O fluxo de líquido dentinário dentro dos túbulos, quando aquecido, também pode aumentar a condução de calor dentro da polpa, mas quando as luzes dos fotopolimerizadores são desligadas, a diminuição da temperatura da polpa é mais pronunciada quando a taxa de fluxo é maior (24).

A irradiação que causa elevação da temperatura e excede o limiar da tolerância pulpar causará danos térmicos à polpa dentária. Estudos anteriores demonstraram que o tecido pulpar saudável não é prejudicado termicamente se o equipamento for utilizado dentro dos parâmetros apropriados para que qualquer

aumento de temperatura dentro da polpa dental permaneça até 5,6°C (22, 21). Este limite de aquecimento foi descrito pela primeira vez em um estudo *in vivo* realizado por Zach and Cohen (1965) (21), em que, uma fonte de metal foi aplicada na superfície do esmalte de dentes de macacos Rhesus, isto induziu a necrose em 15% das polpas avaliadas. Quando esse aumento atingiu 11°C, o quadro de necrose foi observado em 60% dos animais.

Por ser circundada por estrutura dentinária rígida e receber irrigação vascular somente através do ápice radicular (sem fornecimento colateral), a polpa é um órgão de baixa resiliência e por isso não responde bem a aumentos de temperatura. Sensibilidade pós-operatória, dor ou mesmo necrose pulpar são efeitos adversos intimamente relacionados ao aquecimento (24, 28).

Estudos *in vitro* têm demonstrado que, no entanto, as células pulpares podem sobreviver ao estresse térmico, possivelmente devido ao aumento da síntese de proteínas choque térmico (28, 29) e a espessura remanescente de estrutura dentária (30, 31).

## 2.2 HEAT SHOCK PROTEIN

As *Heat Shock Proteins* ou proteínas de estresse são um conjunto de proteínas expressadas por todas as organelas de células eucarióticas (32). Estas proteínas são divididas em famílias de acordo com o peso molecular, entre elas estão a HSP 90, HSP 27, HSP 70, HSP 60 e outras (33, 34).

As HSP protegem as células de diversos tipos de danos, sendo expressas em resposta ao calor e a outros estresses celulares. Têm papel na recuperação celular precoce e aumentam a taxa de sobrevivência das células. Além disso, elas são importantes em outros processos celulares e bioquímicos mesmo em situações não estressantes, ajudam no dobramento correto de peptídeos novos e dos desnaturados (o conceito de chaperones moleculares), assim como, no catabolismo de proteínas anômalas, prevenindo interações indesejáveis (33, 28).

Em condições normais, as HSPs têm múltiplas funções celulares. Elas estão envolvidas no transporte de proteínas intracelulares, na ativação de vias regulatórias específicas, medeiam a ativação de fatores de transcrição, na replicação do DNA, na

seleção de proteínas para degradação, na sinalização intracelular e na apresentação de antígenos (28).

A família da HSP 70 é a uma das classes de HSP mais estudadas. Esta família inclui a HSP 70 induzida pelo estresse e a HSC 70 que é constitutivamente expressada. As HSP 70 são potentes anti-apoptóticos e pro-proliferação de proteínas (35). A expressão de HSP70 induzida pelo estresse bloqueia a via apoptótica em diferentes níveis. HSP70 reduz ou bloqueia a ativação de caspases e suprime o dano mitocondrial e a fragmentação nuclear (36). Porém, a sua indução deve ser rigorosamente controlada, uma vez que sua presença persistente pode afetar negativamente a homeostase protéica e funções intracelulares (35). Kitamura et al. também sugerem que a HSP 70 desempenha função na inibição de apoptose, além de possibilitar a cicatrização celular da polpa dental (37).

### 2.3 FOTOPOLIMERIZADORES LED

O uso de *light emitting diode* (LED) no comprimento de onda azul como método alternativo de fotopolimerização surgiu no início da década de 90 com o intuito de resolver problemas obtidos com aparelhos halógenos de quartzo tungstênio (QTH), como a redução da eficácia ao longo do tempo (38). Os principais objetivos dos LEDs é o de gerar menos calor e o de promover maior agilidade na polimerização de compósitos resinosos (24).

Os primeiros LED introduzidos no mercado emitiam radiação com faixa espectral estreita, com pico em torno de 470nm, comprimento de onda ideal para ativação do fotoiniciador canforoquinona (24). Entretanto, devido a necessidade de se ter resinas com cores mais translúcidas e claras, outros tipos de fotoiniciadores, como a lucerina, surgiram no mercado. Estes são fotoativados por comprimentos de onda menores – próximos ao da luz ultravioleta ( $\approx 410\text{nm}$ ) – e, embora possam ser ativados pelo espectro de emissão mais amplo dos equipamentos de luz halógena, eles são fracamente ativados pelos LED de primeira e de segunda geração (emitem comprimento de onda próximos a faixa de luz azul – 470nm) que emitem pouca luz abaixo de 420 nm (39).

Para resolver esta questão, surgiram os LED de terceira geração, ou seja, aparelhos que emitem luz com mais de uma faixa de comprimento de onda,

geralmente, na faixa de luz violeta e azul. Os fotopolimerizadores desta geração são denominados *multi-wave* ou *multi-peak* ou *polywave*, como por exemplo, o Valo Led (Ultradent Products Inc) e o Bluephase G2 (Ivoclar Vivadent Ltda.). Estes aparelhos devem ser capazes de ativar todos os fotoiniciadores utilizados nos materiais resinosos atuais (39).

Porém, o risco de danos pulpares é maior durante a polimerização de materiais resinosos com estes novos aparelhos, que tem alta potência, comparando com aparelhos de gerações anteriores, pois pode resultar em mais calor transmitido para a polpa dentária (40).

O tipo de aparelho fotopolimerizador é, então, fator crucial na geração de calor. A distância entre o aparelho e a superfície do material restaurador é outro fator que influencia no aumento de temperatura. A maior distância entre o aparelho e a superfície a ser irradiada pode causar insuficiente polimerização do material, devido a redução na energia total. Então a preferência clínica por aparelhos de alta potência ou o aumento no tempo de exposição são recursos utilizados na prática clínica para diminuir o risco de polimerização inadequada. No entanto, estes recursos aumentam as chances de aquecimento pulpar (41).

### 3 OBJETIVO

Esta pesquisa teve por objetivo geral avaliar *in vitro* o potencial da fotopolimerização com aparelho LED em induzir estresse térmico sobre cultura de macrófagos RAW 264.7, assim como, alterações na expressão gênica de HSP70 após serem submetidos ao estresse térmico gerado pelos fotopolimerizadores LED – Valo Led (Ultradent Products Inc), Bluephase G2 (Ivoclar Vivadent Ltda.)

Ainda, teve como objetivos específicos avaliar:

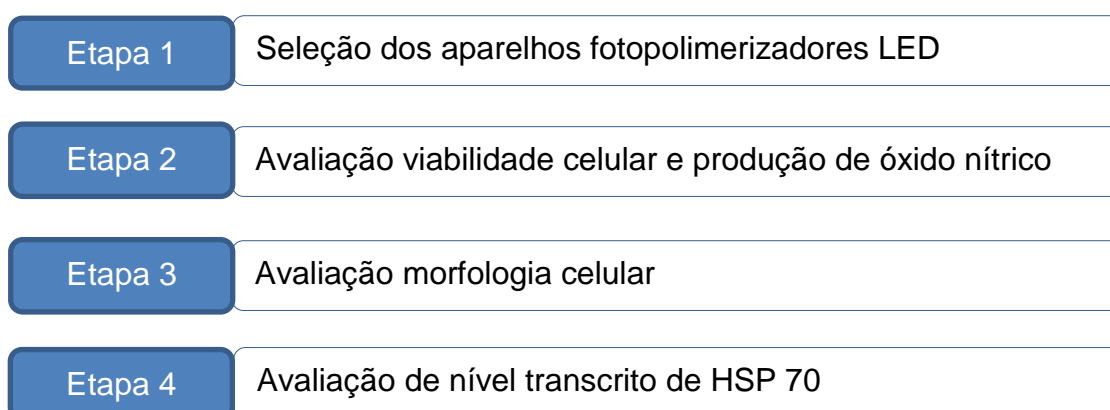
- as possíveis alterações no metabolismo celular por meio do teste de metiltetrazolium (MTT);
- o estresse oxidativo por meio do teste de produção de óxido nítrico (ON);
- alterações da morfologia celular por meio da microscopia eletrônica de varredura (MEV);
- avaliar as possíveis alterações na expressão gênica de HSP70 por meio de *Quantitative Polymerase Chain Reaction* em tempo real (qPCR-RT).

A hipótese nula testada no presente estudo foi de que os fotopolimerizadores LED avaliados não induzem alterações no metabolismo celular, na produção de óxido nítrico, na morfologia celular, na expressão gênica de HSP de células RAW 264.7.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

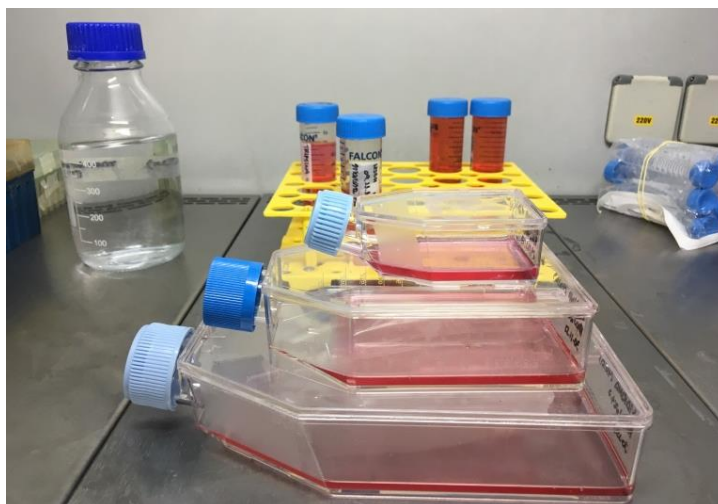
O presente trabalho é um estudo *in vitro* da resposta celular ao calor gerado por dois diferentes fotopolimerizadores LED de alta potência. Foi avaliada a viabilidade celular, produção de óxido nítrico, morfologia celular, nível transcrito de HSP 70.



### 4.2 CULTIVO DAS CÉLULAS RAW 264.7

Para a pesquisa *in vitro* foi utilizada a linhagem celular de um monócito (RAW 264.7), representando uma célula do sistema imune inato. A linhagem de células RAW 264.7 foi obtida do Banco de Células do Rio de Janeiro (CR108). Estas células são macrófagos precursores de osteoclastos, derivados de tumores induzidos em camundongos machos BALB/c infectados com o vírus da leucemia murina de Abelson (42). As células foram cultivadas em garrafas plásticas (Costar Corp., Cambridge, MA, EUA) em meio de cultura DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) (Gibco, EUA), suplementado com 10% de soro bovino fetal (SFB) (Gibco, EUA), 0,5% de solução de aminoácidos MEM (Gibco, EUA) e em estufa contendo 5% de CO<sub>2</sub>, a 37°C e 95% de umidade (43) (Figura 1). Essas células foram

subcultivadas até a obtenção do número de células suficiente para a realização dos experimentos.



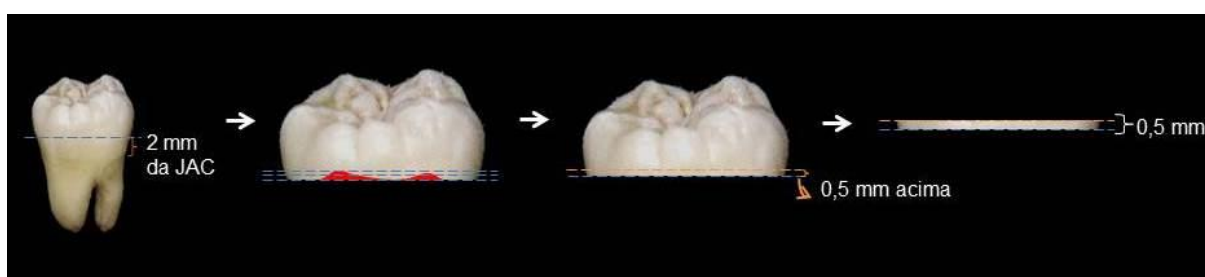
**Figura 1:** Foto ilustrativa do cultivo celular em garrafas plásticas.

Para a realização dos testes de viabilidade celular, produção de óxido nítrico e morfologia celular cinquenta mil células ( $5 \times 10^4$  células por poço) em 1mL meio de cultura DMEM completo foram cultivadas em placa de cultura de 24 poços. Já para a avaliação da expressão gênica do HSP70, através do teste de PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR), trezentas mil células ( $3 \times 10^5$  células por poço) foram cultivadas em 1mL de meio de cultura completo. As placas foram mantidas em atmosfera umedecida de 5% de  $\text{CO}_2$ , na temperatura de 37 °C durante todas as etapas do cultivo. Decorridas as 24 horas de cultura, as placas foram retiradas da estufa e os procedimentos de irradiação com aparelhos LED foram realizados sobre o fundo das placas.

#### 4.3 OBTENÇÃO DO DISCO DE DENTINA

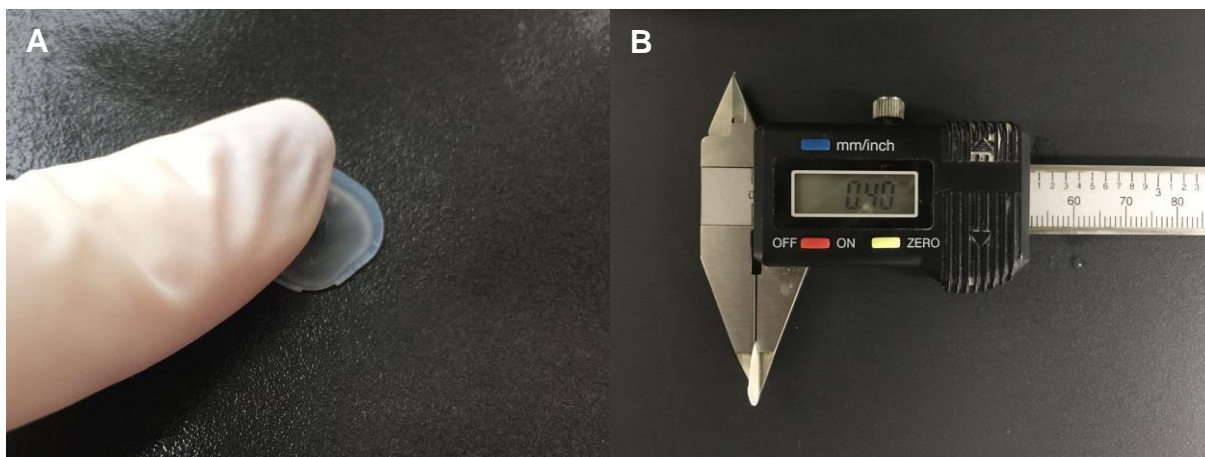
Dente terceiro molar humano hígido foi coletado mediante aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências da Saúde. O dente, após remoção dos restos orgânicos, foi armazenado em solução de timol 0,12%, 4°C, e

utilizados dentro de um período máximo de 3 meses após sua obtenção. Do dente obtido foi realizado um único disco de dentina, correspondente à região imediatamente acima dos cornos pulpares. Para isto, o dente foi fixado em uma base de madeira com godiva, e com auxílio de uma máquina para cortes ISOMET 1000 equipada com disco diamantado (BUEHLER, Lake Bluff, IL, EUA) e sempre refrigerado em água, um primeiro corte transversal foi realizado aproximadamente 2 mm acima da junção amelo-cementária no sentido oclusal, removendo desta forma as raízes dentárias. Cortes seqüenciais foram realizados até a obtenção de uma superfície plana em dentina sem a presença de projeções dos cornos pulpares, inspecionada delicadamente, com auxílio de sonda exploradora. Em seguida, um novo corte foi realizado a 0,5 mm de distância desta superfície, resultando na obtenção de um disco de dentina com essa espessura (Figura 2). O disco foi cuidadosamente inspecionado em microscópio estereoscópico (modelo SZX7, Olympus, São Paulo, Brasil) para verificação da presença de esmalte no lado oclusal e de defeitos resultantes das projeções dos cornos pulpares do lado pulpar. Em seguida, o disco foi manualmente desgastado a custa da face oclusal, com lixa de carbetto de silício 320 umedecida com água destilada até a espessura final de 0,4 mm (simulando cavidade muito profunda), determinada com o auxílio de um paquímetro digital com precisão de 0,01 mm (Mitutoyo Sul Americana Ltda, Suzano, São Paulo, Brasil) (Figura 3). O disco de dentina foi armazenado em tampão fosfato (PBS, pH 7,2).



**Figura 2:** Esquema ilustrativo de obtenção do disco de dentina com espessura inicial de 0,5mm.





**Figura 3:** Imagem ilustrativa da obtenção da espessura final de 0,4mm do disco de dentina. (A) Disco sendo lixado na face oclusal para obtenção da espessura final. (B) Mensuração da espessura final com paquímetro.

#### 4.4 PROCEDIMENTO DE FOTOPOLIMERIZAÇÃO

Os aparelhos fotopolimerizadores LED usados no experimento foram o Valo Led (Ultradent Products Inc) e Bluephase G2 (Ivoclar Vivadent Ltda.). As informações sobre a intensidade de luz usada e o tempo de fotopolimerização estão na Tabela 1.

**Tabela 1** - Fotopolimerizadores testados, potência, tempo de fotopolimerização, densidade de energia

Fotopolimerizador	Potência	Tempo total de fotopolimerização	Densidade de energia (J/cm <sup>2</sup> )
Valo Led (Ultradent Products Inc)	Modo X-POWER – 3200mW/cm <sup>2</sup>	40s	80J/cm <sup>2</sup>
Bluephase G2 (Ivoclar Vivadent Ltda.)	Modo HIGH POWER – 1200mW/cm <sup>2</sup>	40s	30J/cm <sup>2</sup>

Para avaliação da viabilidade celular, da produção de óxido nítrico e da morfologia celular, os grupos foram divididos em sete, do seguinte modo: G1 – grupo controle; G2 – Valo; G3 – Valo e dentina; G4 – Valo e dentina e resina; G5 – Bluephase; G6 – Bluephase e dentina; G7 – Bluephase e dentina e resina (Tabela 2). Todos os grupos receberam irradiação através da base da placa. Os G2 e G5

receberam irradiação diretamente sobre a base da placa sem interposição de barreira. Os G3 e G6 receberam irradiação sobre o fundo da placa usando um disco de dentina de espessura de 0,4mm como barreira. Já os grupos G4 e G7 foram irradiados com interposição de um disco de dentina (0,4mm de espessura) junto a um disco de resina polimerizado tendo 1mm de espessura (resina 3M Z350XT cor A3D) para simular uma situação clínica de uso do aparelho fotopolimerizador. O grupo G1 foi o controle, não recebeu irradiação. Os grupos testes receberam a incidência do fotopolimerizador através do fundo da placa na região de cada poço por tempo total de 40 segundos (Figura 4).

**Tabela 2** - Divisão dos grupos experimentais

Grupos experimentais	Tratamento recebido
<b>G1</b>	Grupo controle negativo
<b>G2 (VALO 1)</b>	Irradiação com o VALO diretamente sobre as células
<b>G3 (VALO 2)</b>	irradiação com o VALO com interposição de disco de dentina
<b>G4 (VALO 3)</b>	irradiação com o VALO com interposição de disco de dentina e de resina
<b>G5 (BLUEPHASE 1)</b>	Irradiação com o BLUEPHASE diretamente sobre as células
<b>G6 (BLUEPHASE 2)</b>	irradiação com o BLUEPHASE com interposição de disco de dentina
<b>G7 (BLUEPHASE 3)</b>	irradiação com o BLUEPHASE com interposição de disco de dentina e de resina



**Figura 4:** Demonstração do procedimento de fotopolimerização através da base da placa de cultivo celular de 24 poços.

Os grupos testes (G2, G3, G4, G5, G6, G7) receberam irradiação com os respectivos aparelhos LED 24 horas após o cultivo celular em placas de cultura de

24 poços (Figura 5). Todos os grupos testes foram mantidos protegidos com papel alumínio o tempo todo para evitar a radiação da luz do ambiente. A permanência de cada grupo fora da estufa foi de 30 minutos, tempo suficiente para que eles fossem tratados com os aparelhos fotopolimerizadores. O grupo teste, apesar de não ter recebido tratamento, também foi mantido fora da estufa protegido por papel alumínio durante o mesmo tempo dos demais.

Após a fotopolimerização, as placas de cultivo foram armazenadas na estufa em atmosfera umedecida de 5% de CO<sub>2</sub>, na temperatura de 37°C.



**Figura 5:** Ilustração das placas de cultivo de 24 poços juntamente com os discos de dentina e resina e os aparelhos LED Valo e Bluephase

Os testes para análise da viabilidade celular (MTT), do estresse oxidativo (ON) e da morfologia celular (MEV) foram realizados 72h após o tratamento das células com os LED, já o teste para análise da expressão de HSP 70 (qPCR-RT) foi iniciado 6h após o tratamento.

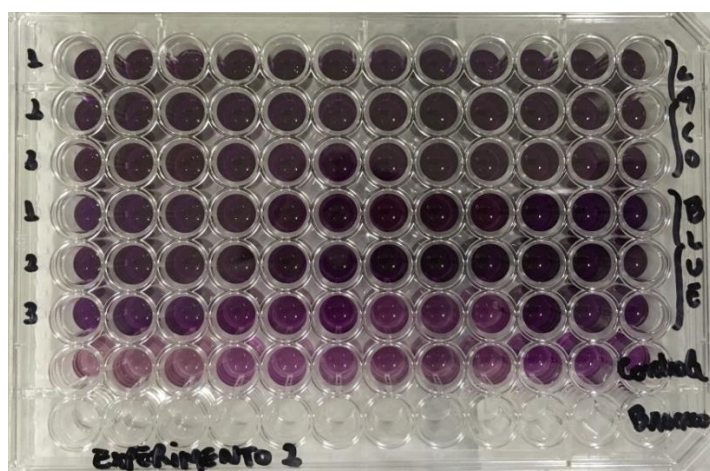
#### 4.5 ANÁLISE DA VIABILIDADE CELULAR PELO ENSAIO DE MTT

Amostras de cada grupo foram utilizadas para avaliação do metabolismo celular através do teste de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de

tetrazolina). O MTT determina a atividade da enzima desidrogenase succínica produzida pelas mitocôndrias celulares. A análise do metabolismo celular foi realizada por meio da avaliação colorimétrica da reação das mitocôndrias das células viáveis ao sal de brometo [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium] (MTT). Quando as células são expostas ao sal de MTT, desidrogenases mitocondriais clivam o anel de tetrazólio transformando o meio em um composto de coloração arroxeada, resultante dos cristais de formazan (44).

Para o experimento, a viabilidade foi analisada pelo teste de MTT 72 horas após a fotopolimerização. As células em contato com a solução de MTT foram incubadas por 4 horas a 37°C em 5% CO<sub>2</sub>. Decorrido este período, a solução de MTT foi removida cuidadosamente e substituída por 350 µl da solução de DMSO (Sigma Aldrich Chemical Co., St. Louis, MO, EUA), a qual apresenta como objetivo dissolver os cristais violeta resultantes da clivagem do anel do sal de metiltetrazolium pela enzima desidrogenase succínica das mitocôndrias das células viáveis (Figura 6) (44). Após homogeneização, a solução foi ressuspenso e foi depositado 100 µl em três poços de uma placa de 96 para quantificação da absorbância a 595nm em leitor de ELISA (EON; Thermoplate, Shenzhen, China).

Os resultados foram calculados por meio da média em valores numéricos das alíquotas de cada poço. Os valores finais obtidos para cada grupo experimental e controle foram submetidos à análise estatística. O experimento foi realizado em triplicata, em momentos diferentes, com n=12.

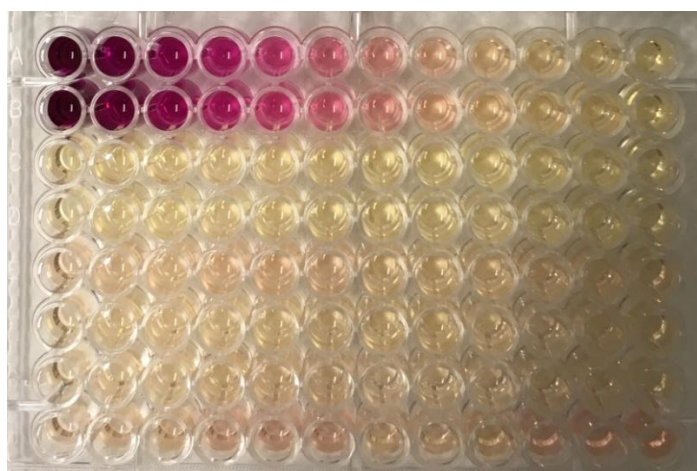


**Figura 6:** Placa demonstrativa do teste colorimétrico de viabilidade celular MTT. A cor arroxeada evidencia maior viabilidade, proporcional a produção de desidrogenase succínica.

#### 4.6 ANÁLISE DA PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO

A taxa de produção de óxido nítrico foi usada para análise do estresse oxidativo. O teste é realizado pela avaliação colorimétrica da reação entre os radicais livres de óxido nítrico e uma solução reveladora. É feita uma curva padrão de nitrito de sódio através de diluição seriada, o nitrito em contato com a solução reveladora forma uma escala que vai do roxo até amarelo claro (45).

Para este teste, 100µL do sobrenadante de cada amostra do meio de cultura das placas do ensaio de MTT foram removidos três vezes e colocado em três poços da placa de 96 poços 72 horas após a irradiação das células. Em cada poço da placa de 96 foi adicionado 100µL de solução reveladora. Em seguida, se realizou a leitura da absorbância em leitor de ELISA à 490nm (EON; Thermoplate, Shenzhen, China) (Figura 7).



**Figura 7:** Placa demonstrativa do teste colorimétrico de produção de Óxido Nítrico. As linhas A e B representam a curva padrão de colorimetria para referência dos valores de absorbância, durante a leitura, enquanto as linhas C, D, E, F, G e H de coloração clara demonstram que não foi evidenciada produção significativa de óxido nítrico no experimento realizado.

#### 4.7 ANÁLISE DA MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

Dois espécimes de cada grupo foram destinados para a avaliação da morfologia celular em microscópio eletrônico de varredura (JSM-7001F Field Scanning Electron Microscope, JEOL, EUA). Para o experimento, lamínulas de vidro com 12 mm de diâmetro (Fisher Scientific, Suwanee, GA, EUA) foram posicionadas na base dos compartimentos da placa de cultura de 24 poços antes do cultivo celular. Para esta etapa do experimento, as lamínulas foram previamente lavadas com uma solução salina fosfatada tamponada (PBS) e esterilizadas quimicamente em etanol a 70% por no mínimo 6 horas. Em seguida, em capela de fluxo laminar vertical, elas foram lavadas em PBS, por três vezes sob agitação constante, durante quinze minutos cada lavagem para remoção de resíduos da solução de etanol. Posicionadas as lamínulas no fundo dos poços, estes foram preenchidos com 1 mL de meio de cultura DMEM completo viabilizando o plantio das células como no início do experimento. Decorridas 24 horas do plantio celular, as células foram irradiadas com os respectivos aparelhos LED.

Após 72 horas do tratamento com luz, os sobrenadantes foram removidos e as células aderidas às lamínulas de vidro foram fixadas por vinte e quatro horas em glutaraldeído 2,5% com pH ajustado em 7,2. Decorrido este tempo, as lamínulas foram lavadas por três vezes com 1 mL de PBS (cinco minutos cada lavagem), seguida de lavagem por duas vezes em 1 mL de água destilada (quinze minutos cada lavagem), e desidratação em 1 mL de solução de etanol 30%, 50% e 70%, 2x 95% e 2x 100% (trinta minutos em cada solução). Então, a última solução foi descartada e as lamínulas contendo as células foram removidas do fundo dos compartimentos com uma pinça cirúrgica e sonda exploradora e, em seguida, fixadas em stubs. Estes foram mantidos por quarenta e oito horas no dessecador e, após isso, foram metalizados e analisados em microscópio eletrônico de varredura (JEOL JSM-7001F; Field Emission Scanning Electron Microscope) para determinação da morfologia celular.

#### 4.8 ANÁLISE DE NÍVEL TRANSCRITO DE HSP 70

O nível de transcrito do gene HSP70 foi verificado por meio do método de PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR). As células RAW 264.7 foram cultivadas em placa de cultura de 24 poços, na concentração de  $3 \times 10^5$  células por poço 1mL de meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) (Gibco, EUA), suplementado com 10% de SFB (Gibco, EUA) e mantidas em estufa contendo 5% de CO<sub>2</sub>, a 37°C e 95% de umidade. Posteriormente, foram estimuladas com os respectivos fotopolimerizadores. Decorridas 6 horas do tratamento com a luz, um *pool* de células com três poços de cada grupo citado anteriormente foram lisadas com Trizol (Invitrogen), e o RNA foi extraído conforme protocolo previamente estabelecido. A concentração e a pureza do RNA extraído foi avaliada por espectrofotômetro (NanoDrop 2000, Thermo Scientific), aferindo a absorbância em 260 nm e a razão de A260/A280. As amostras de RNA foram aplicadas em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo (0,5 µg/mL) para avaliar a integridade e qualidade do RNA. A síntese de cDNA foi realizada a partir de 1 µg de RNA total de cada amostra, utilizando o kit RT2 First Strand Kit (Qiagen), conforme instruções do fabricante. Para a PCR em tempo real, o kit GoTAQ® qPCR Master Mix (Promega, A6001) foi utilizado, observando as recomendações do fabricante. Uma alíquota de 1/5 da reação de cDNA foi inserida em reação de amplificação de PCR em tempo real, em um volume final de 10 µL (5 µL de GoTAQ® qPCR Master Mix (Promega), 2,0 µL de cDNA, 2,6 µL de água deionizada e 0,2 µM de cada oligonucleotídeo específico *forward* e *reverse* apresentados na Tabela 2. Todos os oligonucleotídeos foram validados previamente, e o experimento foi realizado em triplicata em momentos diferentes.

**Tabela 3** - Sequência de oligonucleotídeos

GENES	FORWARD	REVERSE
<b>GAPDH</b>	TGAAGCAGGCATCTGAGGG	CGAAGGTGGAAGAGTGGGAG
<b>Hsp70</b>	CAGCGAGGCTGACAAGAAGAA	GGAGATGACCTCCTGGCACT

#### 4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para os dados obtidos no teste de MTT e NO, a normalidade foi avaliada por meio do teste estatístico Shapiro Wilk. Em ambos os casos, não foi observada distribuição normal dos dados, o que indicou o uso dos testes não-paramétricos Kruskal-Wallis e Mann-Whitney para análise estatística. Para os dados de PCR-RT, foi utilizado o teste ANOVA complementado por Tukey.



## 5 RESULTADOS

### 5.1 ENSAIO DO MTT

A fim de verificar a normalidade dos dados obtidos pelo ensaio de MTT, utilizou-se o teste de Shapiro Wilk ( $p=0.000$ ), o qual identificou a não normalidade dos mesmos. Dessa forma, optou-se por utilizar testes não paramétricos para análise estatística. O teste Kruskal-Wallis identificou diferença estatisticamente significativa entre os grupos ( $p=0.0001$ ). Na tabela 4 estão apresentados os valores de média e desvio padrão, assim como mediana e distância interquartil, além dos resultados da análise estatística obtida por meio do teste de Mann-Whitney dos dados de absorvância obtidos pelo MTT.

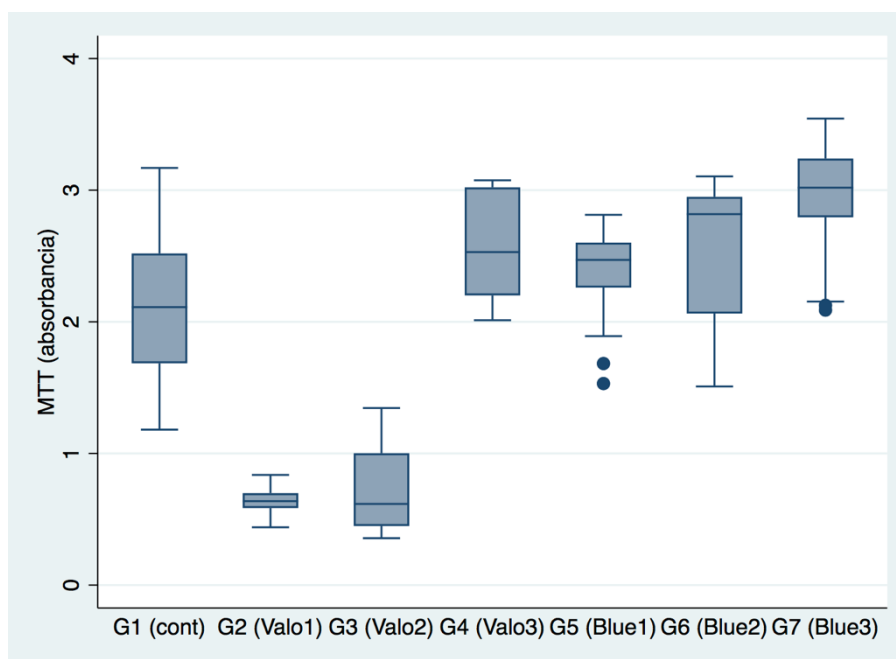
**Tabela 4** - Valores da média e desvio-padrão assim como da mediana e distância interquartil dos valores em absorvância do teste de MTT

Grupo	Média (DP)	Mediana (IQR)
<b>1-Controle negativo</b>	2.10 (0.57) <sup>a</sup>	2.11 (1.68-2.52)
<b>2-VALO1</b>	0.64 (0.10) <sup>b</sup>	0.64 (0.58-0.70)
<b>3-VALO2</b>	0.75 (0.35) <sup>b</sup>	0.62 (0.45-1.01)
<b>4- VALO3</b>	2.59 (0.41) <sup>c</sup>	2.53 (2.20-3.02)
<b>5-BLUEPHASE1</b>	2.41 (0.11) <sup>a,c</sup>	2.47 (2.26-2.61)
<b>6-BLUEPHASE2</b>	2.52 (0.31) <sup>c</sup>	2.82 (2.06-2.94)
<b>7-BLUEPHASE3</b>	2.94 (0.18) <sup>d</sup>	3.02 (2.79-3.24)

\*letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa entre os grupos (Mann-Whitney).

Observa-se que os grupos Valo1 (irradiação diretamente sobre as células) e Valo 2 (irradiação com interposição dentinária) resultaram nos menores valores de MTT quando comparados com o controle negativo ( $p<0.05$ ). Essa redução do metabolismo celular variou entre 64,28 a 69,52 %. Ainda, os grupos Valo3, Bluephase 2 e Bluephase 3 apresentaram valores de metabolismo celular estatisticamente superiores ao controle negativo ( $p<0.05$ ). O aumento observado no

metabolismo celular foi de 23,33%, 20%, 40% respectivamente. A figura 8 apresenta a distribuição dos valores de absorvância obtidos no ensaio de MTT em um gráfico do tipo box-plot.



**Figura 8:** Gráfico do tipo box-plot com valores de absorvância em  $\mu\text{M}$  obtidos no ensaio de MTT, após 72h de incubação, para os diferentes grupos experimentais (G1 – grupo controle; G2 - irradiação com o Valo diretamente sobre as células; G3 - irradiação com o Valo com interposição de disco de dentina; G4 - irradiação com o Valo com interposição de disco de dentina e disco de resina; G5 - irradiação com o Bluephase diretamente sobre as células; G6 - irradiação com o Bluephase com interposição de disco de dentina; G7 - irradiação com o Bluephase com interposição de disco de dentina e disco de resina). As barras representam a mediana e a distribuição dos valores de absorvância divididos em quartis após os testes de Kruskal-Wallis ( $p=0.0001$ ) e de Mann-Whitney.

## 5.2 ENSAIO DE NO

Assim como os dados obtidos pelo ensaio de MTT, os dados obtidos no ensaio de NO não apresentaram uma distribuição normal e por isso testes não paramétricos foram utilizados na análise estatística. O teste de Kruskal Wallis identificou diferença estatisticamente significativa entre os grupos ( $p=0.0000$ ). A tabela 5 apresenta os valores de média e desvio padrão, assim como mediana e

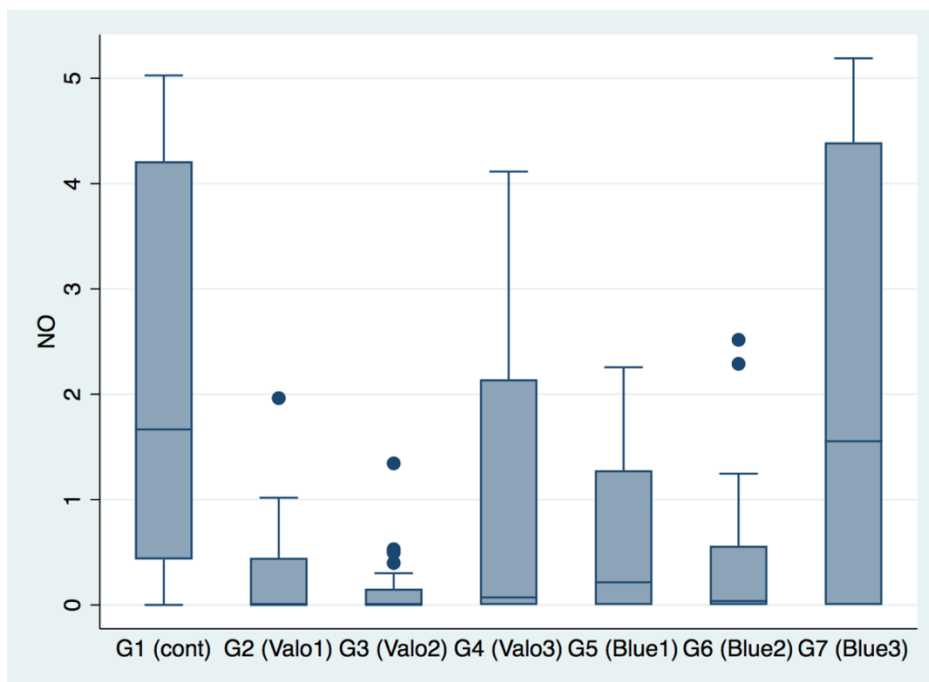
distância interquartil, além dos resultados da análise estatística obtida por meio do teste de Mann-Whitney para os valores de ON detectados.

**Tabela 5** - Valores da média e desvio-padrão assim como da mediana e distância interquartil dos valores em absorvância do teste de NO

<b>Grupo</b>	<b>Média (DP)</b>	<b>Mediana (IQR)</b>
<b>1-Controle negativo</b>	2.17 (1.97) <sup>a</sup>	1.66 (0.43-4.22)
<b>2-VALO1</b>	0.26 (0.46) <sup>b</sup>	0 (0 -0.45)
<b>3- VALO2</b>	0.15 (0.31) <sup>b</sup>	0 (0-0.15)
<b>4- VALO3</b>	1.17 (1.42) <sup>b,c</sup>	0.07 (0-2.14)
<b>5-BLUEPHASE1</b>	0.66 (0.84) <sup>b</sup>	0.21 (0-1.27)
<b>6-BLUEPHASE2</b>	0.45 (0.72) <sup>b</sup>	0.036 (0-0.56)
<b>7-BLUEPHASE3</b>	2.13 (2.15) <sup>a,c</sup>	1.55 (0-4.39)

\*letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa entre os grupos (Mann-Whitney).

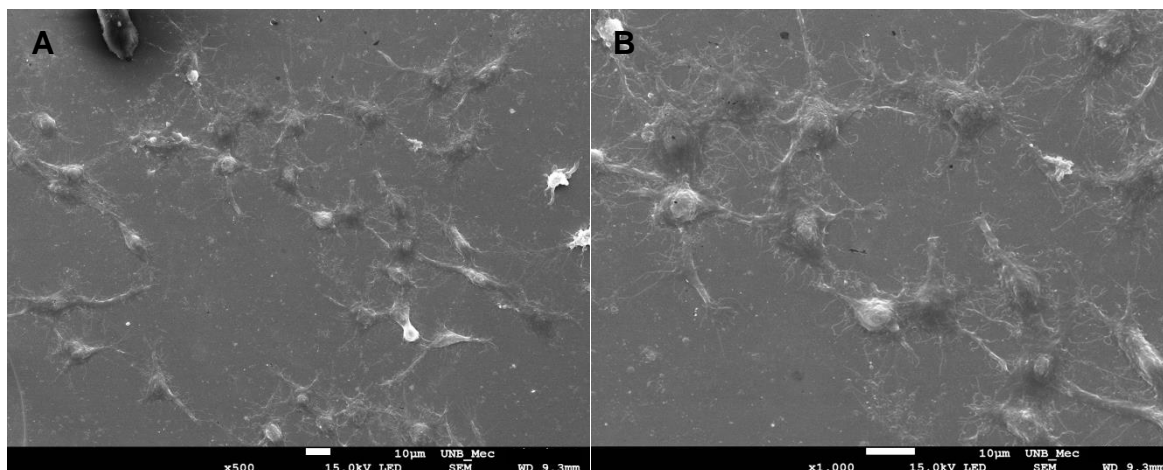
Observa-se a partir dos dados que a produção de oxido nítrico foi baixa para todos os grupos, sendo que o grupo controle (G1) assim como Bluephase 3 (G7) foram os que apresentaram valores estatisticamente superiores aos demais grupos ( $p < 0.05$ ). A figura 9 apresenta a distribuição dos valores de absorvância obtidos no ensaio de ON em um gráfico do tipo box-plot.



**Figura 9:** Gráfico do tipo box-plot com valores de absorvância em  $\mu\text{M}$  obtidos no ensaio de ON, após 72h de incubação, para os diferentes grupos experimentais (G1 – grupo controle; G2 - irradiação com o Valo diretamente sobre as células; G3 - irradiação com o Valo com interposição de disco de dentina; G4 - irradiação com o Valo com interposição de disco de dentina e disco de resina; G5 - irradiação com o Bluephase diretamente sobre as células; G6 - irradiação com o Bluephase com interposição de disco de dentina; G7 - irradiação com o Bluephase com interposição de disco de dentina e disco de resina). As barras representam a mediana e a distribuição dos valores de absorvância divididos em quartis após os testes de Kruskal-Wallis ( $p=0.0000$ ) e de Mann-Whitney.

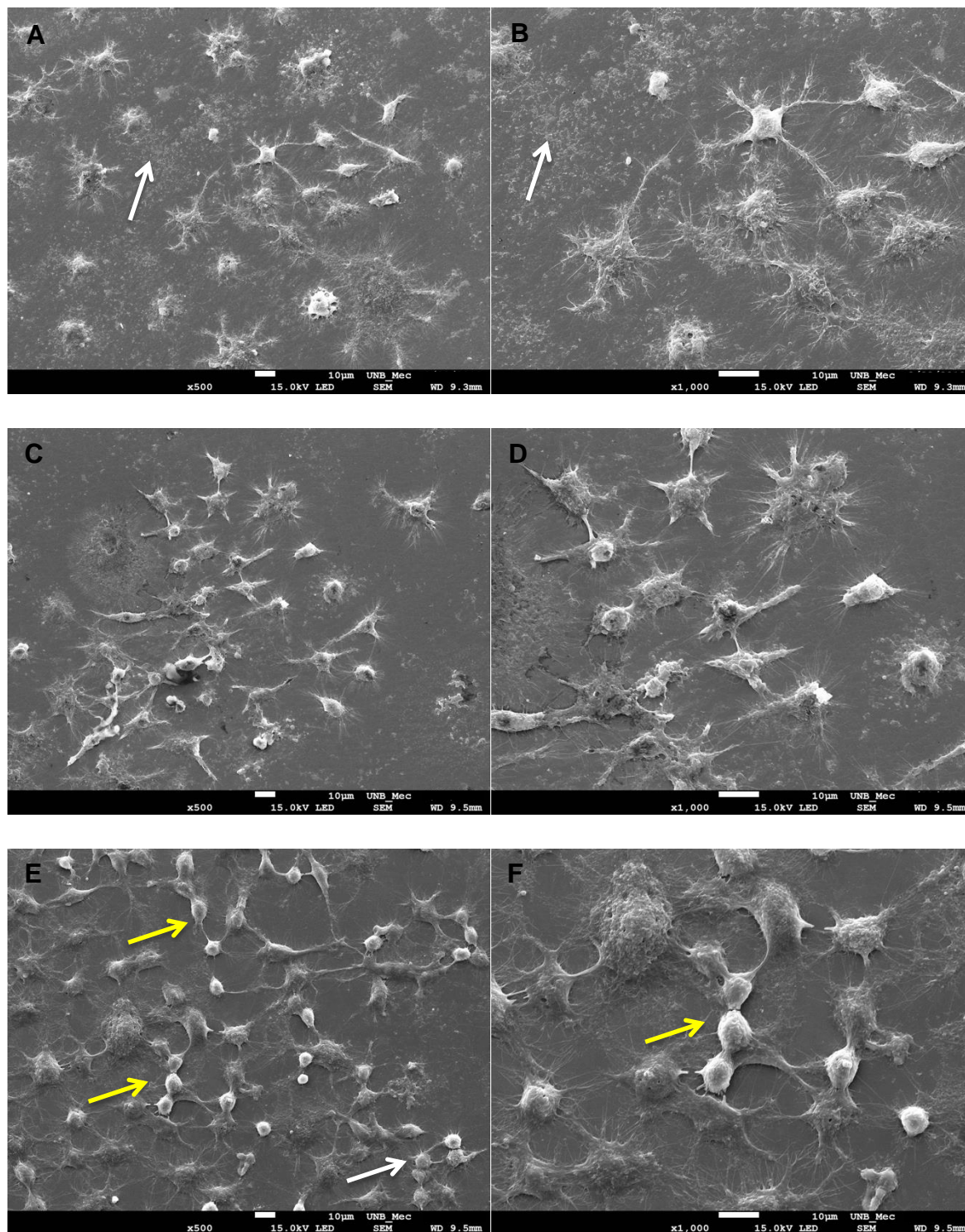
### 5.3 MORFOLOGIA CELULAR (MEV)

A Figura 10 é representativa do grupo controle negativo, no qual, os macrófagos foram expostos somente ao meio de cultura ao longo do experimento. Observa-se que a lamínula não se encontra confluenta. Ainda, observa-se a morfologia celular característica da cultura RAW com células arredondadas e a presença de delgados filamentos citoplasmáticos recobrimdo o substrato de vidro e aderindo às células ao mesmo.



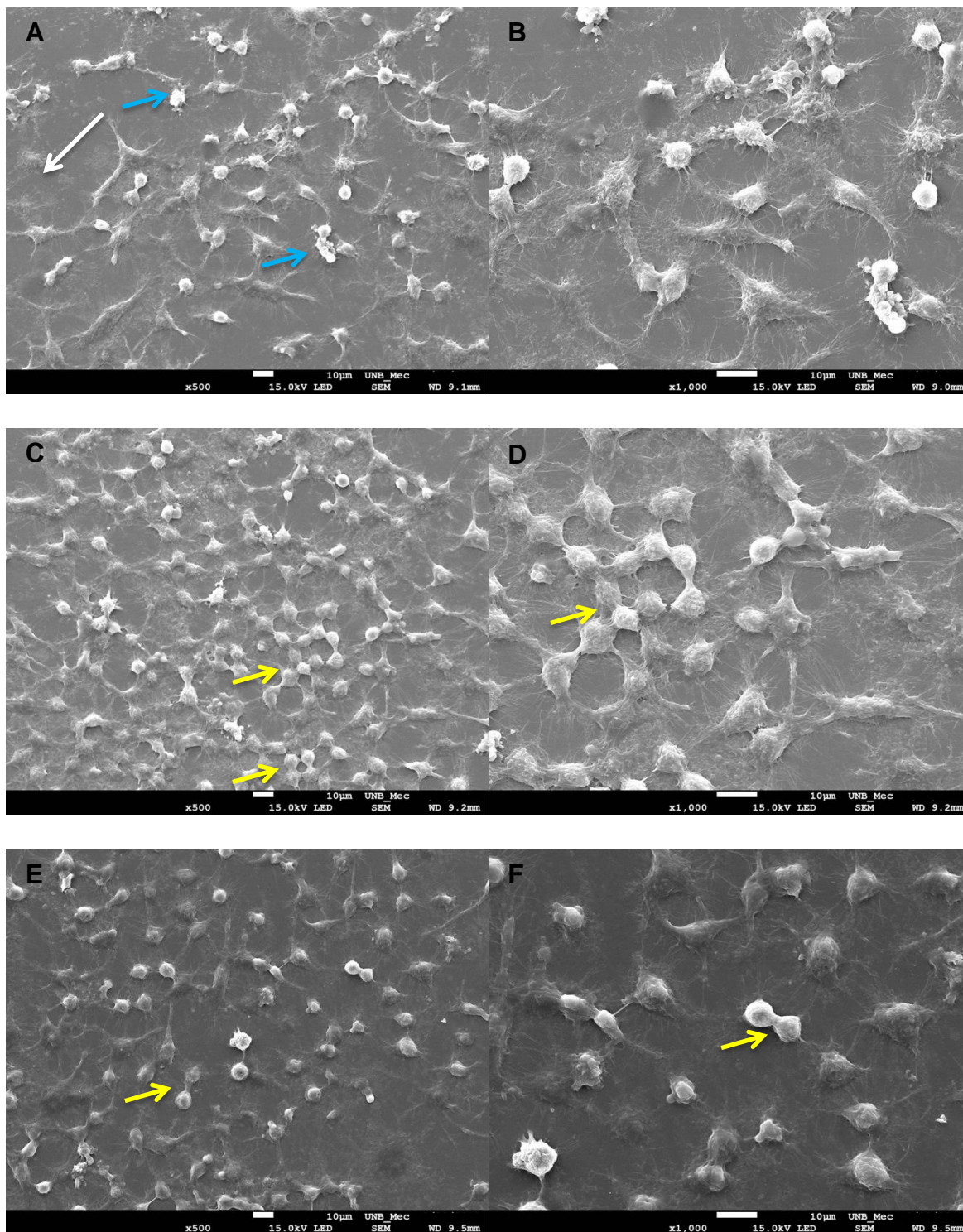
**Figura 10:** Imagens representativas do grupo controle - exposto apenas ao meio de cultura DMEM. Observa-se a não confluência da lamínula e a morfologia celular arredondada e com a presença de delgados filamentos citoplasmáticos. (A) aumento de 500X; (B) aumento de 1000X.

A Figura 11 é representativa dos grupos submetidos a fotopolimerização com Valo nas diferentes condições experimentais. Observa-se para figuras 11A e 11B, a presença de células com menor número de prolongamentos entre elas. Ainda, as setas brancas indicam presença de restos/fragmentos celulares evidenciando morte celular nesses grupos, que foram irradiados diretamente sem presença de barreira dentinária ou resinosa. As figuras 11C e 11D são representativas dos grupos irradiados com Valo na presença de barreira dentinária. Observa-se uma morfologia semelhante ao grupo anterior, com modificações nos prolongamentos citoplasmáticos e presença de regiões que indicam presença de restos/fragmentos celulares. Já para o grupo irradiado na presença de barreira dentinária e resinosa (Figuras 11 E e F), observa-se um maior número de células com manutenção de morfologia características dos macrófagos RAW. Ainda, as setas amarelas indicam um maior número de mitoses para esse grupo, justificando os valores aumentados de metabolismo celular observado para o mesmo.



**Figura 11:** Imagens representativas dos grupos expostos a irradiação do aparelho Valo LED. As setas brancas indicam presença de restos/fragmentos celulares evidenciando morte celular e as setas amarelas indicam presença de mitoses. (A) (B) Grupo Valo 1 - aumento de 500X e aumento de 1000X, respectivamente; (C) (D) Grupo Valo 2 - aumento de 500X e aumento de 1000X, respectivamente; (E) (F) Grupo Valo 3 - aumento de 500X e aumento de 1000X, respectivamente.

A Figura 12 é representativa dos grupos submetidos a fotopolimerização com Bluephase nas diferentes condições experimentais. Observa-se para figuras 12A e 12B, a presença de células com morfologia celular um pouco alterada, mais circular e com menor número de prolongamentos entre elas (setas azuis). Ainda, as setas brancas indicam presença de restos/fragmentos celulares evidenciando morte celular nesses grupos, que foram irradiados diretamente sem presença de barreira dentinária ou resinosa. As figuras 12C e 12D são representativas dos grupos irradiados com Bluephase na presença de barreira dentinária. Observa-se uma morfologia semelhante ao grupo controle e com uma grande quantidade de mitoses (setas amarelas). O mesmo padrão morfológico foi observado para o grupo irradiado na presença de barreira dentinária e resinosa (Figuras 12 E e F), um maior número de células com manutenção de morfologia características dos macrófagos RAW. Ainda, as setas amarelas indicam um maior número de mitoses, justificando os valores aumentados de metabolismo celular observado também para esse grupo.

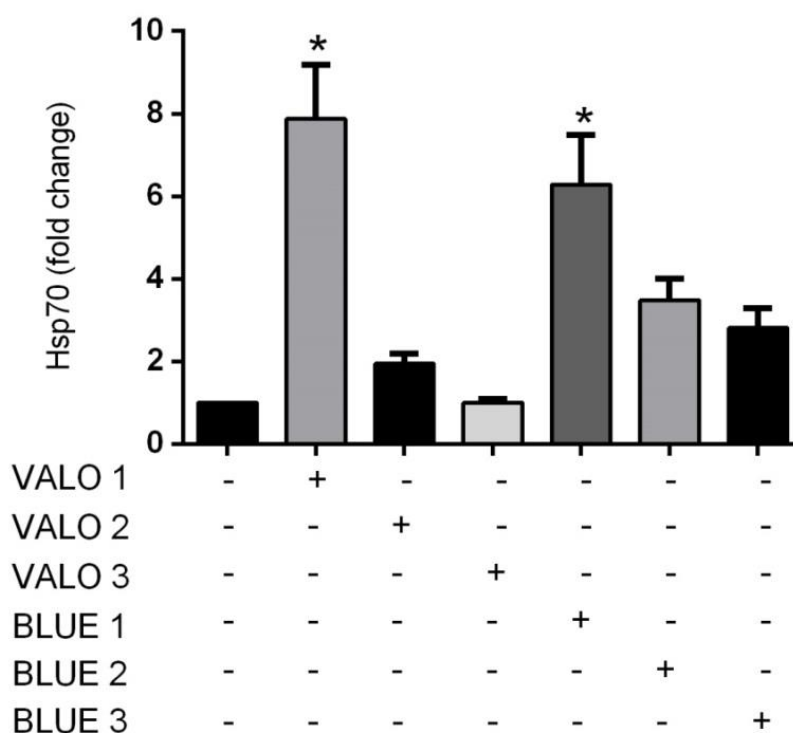


**Figura 12:** Imagens representativas dos grupos expostos a irradiação ao aparelho Bluephase G2. As setas azuis apontam células com morfologia celular um pouco alterada, mais circular e com menor número de prolongamentos entre elas. Já as setas brancas indicam presença de restos/fragmentos celulares evidenciando morte celular e as setas amarelas indicam presença de mitoses. (A) (B) Grupo Bluephase 1 - aumento de 500X e aumento de 1000X, respectivamente; (C) (D) Grupo Bluephase 2 - aumento de 500X e aumento de 1000X, respectivamente; (E) (F) Grupo Bluephase 3 - aumento de 500X e aumento de 1000X, respectivamente.



#### 5.4 NÍVEL TRANSCRITO DE HSP 70

A fim de avaliar os níveis transcritos do gene HSP 70 em células RAW 264.7 submetidas a irradiações com os fotopolimerizadores LED – Valo Led (Ultradent Products Inc) e Bluephase G2 (Ivoclar Vivadent Ltda.) realizou-se o teste de PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR). A figura abaixo representa os dados expressos como a média  $\pm$  SEM de um experimento representativo de três experimentos independentes realizados em triplicata. \* $p < 0,05$  versus grupo sem estímulo, one-way ANOVA e teste de *Tukey*.



**Figura 13:** O gráfico representa os dados expressos como a média  $\pm$  SEM de um experimento representativo de três experimentos independentes realizados em triplicata. \* $p < 0,05$  versus grupo sem estímulo, one-way ANOVA e teste de *Tukey*. Valo 1 – irradiação diretamente sobre as células; Valo 2 – irradiação com interposição de disco de dentina; Valo 3 – irradiação com interposição de disco de dentina e disco de resina. Bluephase 1 – irradiação diretamente sobre as células; Bluephase 2 - irradiação com interposição de disco de dentina; Bluephase 3 - irradiação com interposição de disco de dentina e disco de resina.

Verifica-se que os grupos Valo 1 e Bluephase 1 foram os que apresentaram diferença estatisticamente significantes, ou seja, os que resultaram em maiores valores de nível transcrito de HSP 70 quando comparados com o grupo controle negativo (grupo sem estímulo) ( $p < 0,05$ ). Exceto estes dois grupo, os demais não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre si.

## 6 DISCUSSÃO

Os efeitos do calor sobre a polpa dentária já foram documentados algumas vezes na literatura. Zach e Cohen (1965) foram os precursores destes estudos e relataram em um estudo *in vivo* os danos irreversíveis sobre a polpa dentária de macacos Rhesus quando ocorreu elevação da temperatura em mais de 5,6 °C (21). Apesar de este estudo ser referência na literatura, ainda há dúvidas se esta temperatura limite pode ser considerada para dentes humanos (27, 46). De qualquer forma, pesquisas demonstraram o aumento de temperatura na câmara pulpar devido a aplicação de luzes (nas cores azul ou vermelha) sobre dentes hígidos ou dentes previamente preparados. Com o advento de fotopolimerizadores de alta intensidade de saída de luz, chegando até 3000mW/cm<sup>2</sup>, questionamentos sobre a possibilidade destas luzes de alto desempenho aquecerem a polpa de modo suficiente para causar necrose pulpar apareceram (27, 46). Porém, ainda não há relatos sobre necrose pulpar causada por fotopolimerizadores de alta potência de luz. A necrose pulpar devido ao calor não envolve bactérias e só poderia ser notada muitos meses ou anos depois que a exposição ao calor ocorreu, momento em que o dentista, provavelmente, relacionaria a necrose pulpar com outros fatores, como possíveis cáries secundárias ou trauma (27).

O presente estudo propôs avaliar o potencial de influência de aparelhos fotopolimerizadores LED de terceira geração em induzir estresse térmico sobre cultura celular de macrófagos RAW 264.7, assim como, as alterações nos níveis transcritos de HSP70. Para isso os aparelhos Valo LED (Ultradent Products Inc) e Bluephase G2 (Ivoclar Vivadent Ltda.) foram selecionados. Optou-se por testá-los em sua potência máxima: modo *HIGH POWER* (1200mW/cm<sup>2</sup>) para o Bluephase e modo *X-POWER* (3200mW/cm<sup>2</sup>) para o Valo durante o tempo total de 40 segundos. Os resultados da presente pesquisa rejeitam a hipótese nula avaliada uma vez que ambos os aparelhos testados resultaram em alterações de metabolismo celular, morfologia celular e níveis de expressão gênica de HSP70.

Segundo o estudo de Park SH et al. (2010) (27), é aconselhável limitar o tempo de exposição a 20 segundos para um dispositivo cuja densidade de potência esteja entre 1200 e 1600 mW/cm<sup>2</sup> e a 10 segundos para um dispositivo cuja a

densidade de potência é entre 2000 e 3000 mW/cm<sup>2</sup>. Apesar dessa indicação, a maioria dos cimentos resinosos ou mesmo compósitos no mercado não apresentam em seu manual de instrução diferenciação de tempo de fotopolimerização de acordo com o tipo de aparelho empregado. Dessa forma, comumente, o clínico acaba por empregar o mesmo protocolo de cimentação mantendo um tempo padrão de exposição à luz, sem considerar o tipo de aparelho.

Nesta pesquisa as células foram irradiadas através da base da placa de cultivo celular e durante todo o tempo foram mantidas em meio de cultura DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) (Gibco, EUA), suplementado com 10% de soro bovino fetal (SFB) (Gibco, EUA). Em alguns estudos anteriores, como de Turrioni, A. S. et al. (2010) (47), o meio de cultura foi trocado para um com 0,5% de SFB após 12h de semeadura a fim de causar um estresse nutricional e poder evidenciar o potencial da luz em bioestimular a célula. No entanto, no presente estudo, o objetivo não foi avaliar o potencial em bioestimular as células com LED e sim analisar os possíveis efeitos negativos tanto na viabilidade e morfologia celular como na produção de HSP influenciada apenas pela fotopolimerização intensificada. Dessa forma, foi necessário evitar outros tipos de estresse a fim de focar apenas no possível estresse térmico. Além disso, não houve troca do meio de cultura por um meio incolor, como a solução tampão, imediatamente antes de irradiar as células. O meio de cultura manteve-se o mesmo durante todo o tempo de incubação, ao final do período de 72h para os testes de MTT, ON e MEV e do período de 6h para o teste de qRT-PCR não foi observado alteração de coloração do meio e nem de pH. Sabe-se que o corante presente no meio celular DMEM pode causar absorção dos comprimentos de onda dos aparelhos LED como também mostra Turrioni, A. S. et al. (2010) (47). No entanto, considerando o que é encontrado clinicamente, as células estão em um meio ricamente proteico e de cor vermelha (sangue), de forma que esses fatores podem alterar a absorção de comprimentos de onda.

O disco de dentina utilizado no presente estudo foi de 0,4 mm, o que simula uma cavidade muito profunda sem exposição pulpar. Segundo Turrioni et al. (2013), (48) espessuras maiores, como 0,5 ou 1,0 mm, de dentina atenuam a luz azul de forma mais eficaz, de modo que, um maior valor de irradiação seria necessário para permitir maior passagem da luz. Atualmente com a indicação de sistemas autocondicionantes até mesmo para dentina profunda, é possível que em certas

regiões como nos cornos pulpares, existam regiões em que a dentina seja menor que 0,5 mm. Ainda, no preparo de coroas cerâmicas, sabe-se que a dentina cervical estará mais profunda do que aquela no terço médio. Dessa forma, optou-se por utilizar uma situação extrema a fim de avaliar os possíveis efeitos da luz nessas situações.

Os resultados do presente estudo rejeitam a hipótese nula, uma vez que a irradiação com os aparelhos LED foi capaz de causar alterações significativas no metabolismo e morfologia celulares e assim como induzir a expressão gênica de HSP70. Para a análise da viabilidade celular, o ensaio de MTT foi realizado. Os grupos Valo 1 e Valo 2 apresentaram os menores valores de MTT quando comparados com o controle negativo. Já os grupos Valo 3, Bluephase 2 e Bluephase 3 apresentaram valores de metabolismo celular estatisticamente superiores ao controle negativo. Nestes grupos a irradiação ocorreu com interposição de barreira de dentina e resina ou apenas de dentina. Turrioni et. al (2013) (48) demonstrou que a presença de barreira dentinária com espessura de 0,2mm, 0,5mm, 1mm gera atenuação da incidência luminosa de LED azul de comprimento de onda de 450nm ( $\pm 10$ nm) que varia de 48% (0,2mm), 56% (0,5mm) e 70% (1mm). Além disso, a densidade de potência que atinge as células é muito menor do que a aplicada à dentina, principalmente por causa da dispersão da luz. Em outro estudo, Turrioni et. al (2015) (49) relatou que a irradiação transdental (disco dentina 0,2mm espessura) com LED azul (450nm) ( $25\text{j}/\text{cm}^2$ ) de células tipo odontoblastos foi capaz de causar algum estímulo no metabolismo celular. Estes achados podem justificar o resultado obtido nesta pesquisa, ou seja, apesar do grupo Valo 3 ter sido irradiado com densidade de energia de  $80\text{J}/\text{cm}^2$ , a quantidade de energia total que atingiu as células foi menor devido a presença de barreira de dentina e de resina. Sendo assim, esta densidade de energia total pode ter bioestimulado os macrófagos RAW 264.7. Para os grupos Bluephase 2 e Bluephase 3 a ideia é a mesma. Porém, pouco se sabe sobre os mecanismos de transmissão de luz LED através da dentina e a dose de energia ideal necessária para causar a bioestimulação de células de polpa de dentes previamente submetidas a um estímulo agressivo, mas esta hipótese pode explicar o maior metabolismo celular destes grupos se comparado com o grupo controle.

Com relação aos dados obtidos pela análise de produção de óxido nítrico (ON), observou-se que, em geral, a produção de ON foi baixa para todos os grupos. Os grupos G2 (Valo 1) e G3 (Valo 2) apresentaram menores valores para ON, isto ocorreu devido as menores viabilidades celulares demonstradas no ensaio de MTT para este grupos. Já o grupo controle (G1) assim como Bluephase 3 (G7) foram os que apresentaram valores de ON estatisticamente superiores aos demais grupos. Apesar de ter havido diferença entre estes grupos, a quantidade de ON produzido é consideravelmente baixa para todos, o que indica não haver uma diferença significativa. É possível que a própria metodologia gere algum tipo de estresse celular, uma vez que as células permaneceram fora da incubadora, com variação de temperatura e CO<sub>2</sub>, o que justifica este valor de ON observado para o controle negativo. O ON é um radical livre gasoso, considerado como um dos mediadores da inflamação tecidual (50), mediando atividades pró-inflamatórias e sinais para o crescimento e diferenciação celular (51). O ON desempenha duas funções sobre as células: função de citotoxicidade e função regulatória. Nas funções regulatórias, sob condições fisiológicas, a produção de ON é reduzida, mediando o relaxamento de vasos, o controle da adesão e a agregação plaquetária e de neutrófilos (52). Contudo, a citotoxicidade é observada quando há grande produção de ON por macrófagos, hepatócitos e outras células, após a exposição a citocinas ou a outros agentes inflamatórios (53). Os resultados deste estudo permitem observar que, em geral, a irradiação com os diferentes LED não elevaram a produção de ON em comparação ao controle. Nos grupos em que se observou uma redução do metabolismo celular, este não aumento de ON pode ser resultado da maior quantidade de células mortas logo após o procedimento de fotopolimerização, não deixando tempo hábil para produção de ON. Ainda, existem outros radicais livres que indicam estresse oxidativo e que não foram investigados na presente pesquisa, tais como peróxido de hidrogênio, íons de hidrogênio.

A resposta ao choque térmico é de extrema importância para que as células sobrevivam aos estímulos letais, desempenhando um papel efetivo muito importante na sobrevivência celular. Assim, este mecanismo tem despertado interesse por causa de seu papel protetor na sobrevivência aos estímulos térmicos e não térmicos letais. Atualmente, se sabe que esta resposta pode proteger as células através da inibição da expressão de genes pró-inflamatórias, meditando assim os efeitos anti-

inflamatórios (54). O HSP 70 mostrou desempenhar um papel significativo na recuperação de células estressadas, ajudando as proteínas danificadas a redobram ou participando da síntese de novas proteínas substitutas (55, 56).

Nesta pesquisa avaliamos os níveis transcritos de HSP 70. Células submetidas ao choque térmico podem apresentar um aumento significativo na síntese de HSP (28). Através do teste qRT-PCR, verificou-se que os grupos Valo 1 e Bluephase 1 apresentaram diferença estatisticamente significante quando comparados com o grupo controle, ou seja, resultaram em maiores valores de nível transcrito de HSP 70 quando comparados com o grupo sem estímulo. A irradiação nestes grupos foi realizada diretamente sobre as células, diferente dos demais grupos, ou seja, não houve barreiras que minimizassem a incidência da luz sobre elas, o que pode justificar a maior transcrição de HSP 70.

Estudo *in vitro* realizado por Amano T et al. (2006) (57) com células da polpa dentária de rato submetidas a aumento de temperatura (42°C) mostrou a expressão de HSP 70 uma hora após o estresse térmico e o aumento desta expressão até seis horas após o aquecimento. A degradação da viabilidade da polpa induzida pelo calor foi recuperada dentro de 3 horas após o estresse. Segundo os autores, isso sugere que o HSP 70 desempenha função na rápida recuperação da polpa dental. Outro estudo, *in vivo*, utilizando irradiação com laser de CO<sub>2</sub> sobre células da polpa de rato demonstrou alta expressão de HSP 70 nos grupos que receberam o tratamento com laser de CO<sub>2</sub> em comparação com o controle, que não recebeu tratamento. Sugerindo que o aumento da temperatura sobre as células da polpa causou um ligeiro dano imediatamente após a irradiação do laser (22). Yamaguchi H et al (2012) observaram, *in vitro*, a expressão de HSP 70 em cultura de fibroblastos da polpa dental humana submetidas à irradiação a laser CO<sub>2</sub>. Os autores sugeriram que o estresse térmico causado pela estimulação ao laser de baixa potência pode estar envolvida na inibição da apoptose, possivelmente, pela regulação da HSP 70 (34). Embora nenhum destes estudos tenha utilizado fotopolimerizadores LED para avaliar a expressão de HSP 70, percebe-se que a expressão de HSP está relacionada a elevação da temperatura. Há escassez de pesquisas relacionando danos celulares com a incidência de fotopolimerizadores LED de alta potência. Mas é sabido que o aumento na expressão de HSP é um mecanismo para verificar os efeitos térmicos.

O presente estudo apresenta algumas limitações que incluem: a ausência de uso de sistemas adesivos – que pode ser um fator irritante para as células ou mais uma barreira para atenuar a intensidade luminosa; o uso de células do tipo macrófagos de rato e não células humanas; a limitação em não representar todos os mecanismos de proteção celular de um organismo vivo, tais como sistemas antioxidantes; a não consideração da distância entre a ponta do aparelho fotopolimerizador e a parede da cavidade a ser irradiada – o que é outro fator atenuante da intensidade de luz que chega a polpa. Apesar dessas limitações, os resultados sugerem que a irradiação com os fotopolimerizadores LED usados na clínica para procedimentos restauradores pode resultar em alterações do metabolismo e morfologia celulares e indução de vias de sinalização para reparar o tecido celular danificado. Porém, estudos adicionais são necessários para melhor evidência dos resultados obtidos, visto que este é um estudo *in vitro*.



## 7 CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos no presente estudo, concluiu-se que:

- Os aparelhos LED testados quando utilizados no modo “High power” e “X-power” foram capazes de causar alterações no metabolismo celular. O aparelho VALO quando utilizado diretamente sobre as células ou apenas com interposição dentinária resultou em redução significativa do metabolismo celular. Já o aparelho Bluephase, na presença de interposição dentinária e/ou resinosa resultou no aumento do metabolismo celular.
- Os aparelhos LED testados quando utilizados no modo “High power” e “X-power” foram capazes de causar alterações na morfologia celular. O aparelho VALO quando utilizado diretamente sobre as células ou apenas com interposição dentinária causou danos celulares que envolveram processo de morte celular evidenciado pela presença de fragmentos celulares na lamínula de vidro. Já o aparelho Bluephase, na presença de interposição dentinária e/ou resinosa resultou no aumento de células em mitose.
- O controle negativo assim como o grupo G7 (Bluephase com interposição dentinária e resinosa) apresentaram os maiores valores de produção de óxido nítrico.
- O nível transcrito de HSP70 foi aumentado nos grupos irradiados diretamente com os fotopolimerizadores.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Lanneau D, de Thonel A, Maurel S, Didelot C, Garrido C. Apoptosis versus cell differentiation. Role of heat shock proteins HSP90, HSP70 and HSP27. *Prion*. 2007;1: 53–60.
2. Pileggi R, Holland GR. The expression of heat shock protein 70 in the dental pulp following trauma. *Dental Traumatology*. 2009;25: 426–428
3. Schlesinger MJ. Heat shock proteins. *J Biol Chem*. 1990;265(21): 12111–12114
4. Amemiya K, Kaneko Y, Muramatsu T, SHIMONO M, Inoue T. Pulp cell responses during hypoxia and reoxygenation in vitro. *Eur J Oral Sci*. 2003;111: 332– 338
5. Sens DA, McGuirt JP, Khan W, Howell RM. Expression of Hsc 70, but not Hsp 70, in human third molar dental pulp. *Eur J Oral Sci*. 1997;105: 271-277
6. Sens DA, McGuirt JP, Khan W, Todd JH, Howell RM. Expression of heat shock protein 27 in adult human third molar dental pulp. *J Oral Pathol Med*. 1996;25: 382-387
7. Giffard RG, Han RQ, Emery JF, Duan M, Pittet JF. Regulation of apoptotic and inflammatory cell signaling in cerebral ischemia: the complex roles of heat shock protein 70. *Anesthesiology*. 2008;109: 339–348
8. Bolger AP, Genth-Zotz S, Anker SD. Heat shock proteins and endotoxin combined as a trigger for inflammatory cytokine release during cardiopulmonary bypass: a possible third way? *Circulation*. 2002;106: 49–50
9. Ohshima H, Ajima H, Kawano Y, Nozawa-Inoue K, Wakisaka S, Maeda T. Transient expression of heat shock protein (Hsp)25 in the dental pulp and enamel organ during odontogenesis in the rat incisor. *Arch Histol Cytol*. 2000;63: 381–395
10. Chen Z, Fan M, Bian Z, Zhang Q, Zhu Q, Lu P. Immunolocalization of heat shock protein 70 during reparative dentinogenesis. *Chin J Dent Res*. 2000;3: 50–55
11. Kawagishi E, Nakakura-Ohshima K, Nomura S, Ohshima H. Pulpal responses to cavity preparation in aged rat molars. *Cell Tissue Res*. 2006;326: 111–122
12. Ohshima H, Nakakura-Ohshima K, Yamamoto H, Maeda T. Alteration in the expression of heat shock protein (Hsp) 25 – immunoreactivity in the dental pulp of rat molars following tooth replantation. *Arch Histol Cytol*. 2001;64: 425–37
13. Shigehara S, Matsuzaka K, Inoue T. Morphological change and expression of Hsp 70, osteopontin and osteocalcin mRNAs in rat dental pulp cells with orthodontic tooth movement. *Bull Tokyo Dent Coll*. 2006;47: 117–124

14. Zach L. Pulp viability and repair: effect of restorative procedures. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1972;33: 111–121
15. Wang X, Zou Y, Wang Y, Li C, Chang Z. Differential Regulation of Interleukin-12 and Interleukin-10 by Heat Shock Response in Murine Peritoneal Macrophages. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 2001;287: 1041-1044
16. Cooper PR, Holder MJ, Smith AJ. Inflammation and Regeneration in the Dentin-Pulp Complex: A Double-edged Sword. *JOE.* 2014;40(4): 46-51
17. Cviki B, Lussi A, Moritz A, Sawada k, Gruber R. Differential inflammatory response of dental pulp explants and fibroblasts to saliva. *International Endodontic Journal.* 2016;49: 655-662.
18. Selcuk S, Murat SB, Ebru K, Tugrul S. Evaluation of temperature changes in the pulp chamber during polymerization of light-cured pulp-capping materials by using a VALO LED light curing unit at different curing distances. *Dental Materials Journal.* 2014;33(6): 764–76
19. Valo, Ultradent Products. White Paper, 2012. Em: < <http://www.valo-led.com> >. Acesso em 20 maio 2015
20. Bluephase, SDI. Date information prepared: 2013-04 / Rev. 5l. em: < <http://www.sdi.com.au/> >. Acesso em 20 maio 2015
21. Zach L, Cohen G. Pulp response to externally applied heat. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1965;19: 515–530
22. Lee D, Murakami S, Khan SZ, Matsuzaka K, Inoue T. Pulp Responses After CO2 Laser Irradiation of Rat Dentin. *Photomedicine and Laser Surgery.* 2013;31(2): 59-64
23. Lin M, Xu F, Lu TJ, Bai BF. A review of heat transfer in human tooth - Experimental characterization and mathematical modeling. *Dental Materials.* 2010;26: 501–513
24. Armellin E, Bovesecchi G, Coppa P, Pasquantonio G, Cerroni L. LED Curing Lights and Temperature Changes in Different Tooth Sites. *BioMed Research International.* 2016; 1-10.
25. Hannig M, Bott B. In-vitro pulp chamber temperature rise during composite resin polymerization with various lightcuring sources. *Dental Materials.* 1999;15(4): 275–281
26. Daronch M, Rueggeberg FA, Hall G, de Goes MF. Effect of composite temperature on in vitro intrapulpal temperature rise. *Dent Mater.* 2007;23(10): 1283-1288
27. Park SH, Roulet JF, Heintze SD. Parameters Influencing Increase in Pulp Chamber Temperature with Light-curing Devices: Curing Lights and Pulpal Flow Rates. *Operative Dentistry.* 2010;35(3): 353-361

28. Szymanska Z, Zylicz M. Mathematical modeling of heat shock protein synthesis in response to temperature change. *Journal of Theoretical Biology*. 2009;259(3): 562–569
29. Baldissara P, Catapano S, Scotti R. Clinical and histological evaluation of thermal injury thresholds in human teeth: a preliminary study. *Journal of Oral Rehabilitation*. 1997;24(11): 791–801
30. Kodonas K, Gogos C, Tziafas D. Effect of simulated pulpal microcirculation on intrapulpal temperature changes following application of heat on tooth surfaces. *International Endodontic Journal*. 2009;42(3): 247–252
31. Linsuwanont P, Palamara JEA, Messer HH. An investigation of thermal stimulation in intact teeth. *Archives of Oral Biology*. 2007;52(3): 218-227
32. Hartl FU. Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature*. 1996;381(13): 571-580
33. Pignatelli D, Ferreira J, Soares P, Costa MJ, Magalhaes MC. Immunohistochemical Study of Heat Shock Proteins 27, 60 and 70 in the Normal Human Adrenal and in Adrenal Tumors With Suppressed ACTH Production. *Microscopy Research And Technique*. 2003;61: 315-323
34. Yamaguchi H, Kobayashi K, Nagano T, Shirakawa S, Gomi K, Hosoya N. Effects of Carbon Dioxide Laser Irradiation on Human Pulp Fibroblasts. *Journal of Hard Tissue Biology*. 2012;21(2): 109-112
35. Schmitt E, Gehrman M, Brunet M, Multhoff G, Garrido C. Intracellular and extracellular functions of heat shock proteins: repercussions in cancer therapy. *J Leukoc Biol*. 2007;81: 15–27
36. Buzzard KA, Giaccia AJ, Killender M, Anderson RL. Heat Shock Protein 72 Modulates Pathways of Stress-induced Apoptosis. *The Journal Of Biological Chemistry*. 1998;273(27): 17147–17153
37. Kitamura C, Ogawa Y, Nishihara T, Morotomi T, Terashita M. Transient co-localization of c-Jun N-terminal kinase and c-Jun with heat shock protein 70 in pulp cells during apoptosis. *J Dent Res*. 2003;82: 91-95
38. Knezevic A, Tarle Z, Meniga A, Sutalo J, Pichler G, Ristic M. Degree of Conversion and temperature rise during polymerization of composite resin samples with blue diodes. *Journal of Oral Rehabilitation*. 2001;28(6): 586–591
39. Price RB. The Dental Curing Light. *Dental Composite Materials for Direct Restorations*. 2018;1: 43-62
40. Aravamudhan K, Floyd CJE, Rakowski D. Light emitting diode curing light irradiance and polymerization of resin-based composite. *Journal of the American Dental Association*. 2006;137(2): 213–223

41. Savas S, Botsali MS, Kucukyilmaz E, Sari T. Evaluation of temperature changes in the pulp chamber during polymerization of light-cured pulp-capping materials by using a VALO LED light curing unit at different curing distances. *Dental Materials Journal*. 2014;33(6): 764–769
42. Raschke WC, Baird S, Ralph P, Nakoinz I. Functional macrophage cell lines transformed by Abelson leukemia virus. *Cell*. 1978;15(1): 261-267
43. Zhu XM, Wang YX, Leung KC, Lee SF, Zhao F, Wang DW. Enhanced cellular uptake of aminosilane-coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles in mammalian cell lines. *International journal of nanomedicine*. 2012;7: 953-64
44. Loosdrecht AA, Nennie E, Ossenkoppele GJ, Beelen RH, Langenhuijsen MM. Cell mediated cytotoxicity against U 937 cells by human monocytes and macrophages in a modified colorimetric MTT assay - A methodological study. *J Immunol Methods*. 1991;141(1): 15-22
45. Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. *Anal Biochem*. 1982;126(1): 131-138
46. Rueggeberg FA, Giannini M, Arrais CAG, Price RBT. Light curing in dentistry and clinical implications: a literature review. *Braz. Oral Res*. 2017;31: 64-91
47. Turrioni APS, Alonso JRL, Basso FG, Costa CAS, Hebling J. Synthesis of dental matrix proteins and viability of odontoblast-like cells irradiated with blue LED. *Lasers Med Sci*. 2016;31: 523–530
48. Turrioni AS, Alonso JRL, Basso FG, Moriyama LT, Hebling J, Bagnato VS, de Souza Costa CA. LED light attenuation through human dentin: a first step toward pulp photobiomodulation after cavity preparation. *American Journal of Dentistry*. 2013;26(6): 319–323
49. Turrioni APS, Basso FG, Alonso JRL, de Oliveira CF, Hebling J, Bagnato VS, de Souza Costa CA. Transdental Cell Photobiomodulation Using Different Wavelengths. *Operative Dentistry*. 2015;40(1): 102-111
50. Moilanen E, Vapaatalo H. Nitric Oxide in Inflammation and Immune Response. *Annals of Medicine*. 1995;27: 359-367
51. Teixeira M, Cerqueira F, Barbosa CM, Nascimento MSJ, Pinto M. Improvement of the inhibitory effect of xanthenes on NO production by encapsulation in PLGA nanocapsules. *Journal of Drug Targeting*. 2005;13(2): 129–135
52. Bredt DS, Snyder SH. Transient nitric oxide synthase neurons in embryonic cerebral cortical plate, sensory ganglia, and olfactory epithelium. *Neuron*. 1994;13: 301-313
53. Bellows CF, Alder A, Wludyka P, Bernard MJ. Modulation of macrophage nitric oxide production by prostaglandin D2. *Journal of Surgical Research*. 2006;132: 92–97

54. Wang X, Zou Y, Wang Y, Li C, Chang Z. Differential Regulation of Interleukin-12 and Interleukin-10 by Heat Shock Response in Murine Peritoneal Macrophages. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2001;287: 1041–1044
55. Bukau B, Weissman J, Horwich A. Molecular Chaperones and Protein Quality Control. *Cell*. 2006;125: 443-451
56. Hartl FU, Hayer-Hartl M. Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science*. 2002;295: 1852-1858
57. Amano T, Muramatsu T, Amemiya K, Kubo K, Shimono M. Responses of Rat Pulp Cells to Heat Stress in vitro. *Dent Res*. 2006;85(5): 432-435

## ANEXOS

## ANEXO A – DOCUMENTO DE APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA

10/03/2017 Plataforma Brasil

Saúde

Principal

Marina Mansur Ramagem - Pesquisador 1 232

Cadastros

DETALHAR PROJETO DE PESQUISA

**DADOS DA VERSÃO DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** INFLUÊNCIA DA FOTOPOLIMERIZAÇÃO COM APARELHOS LED NA INDUÇÃO DE ESTRESSE TÉRMICO SOBRE CULTURA DE CÉLULAS DA POLPA DENTAL

**Pesquisador Responsável:** Marina Mansur Ramagem

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 51269815.2.0000.0030

**Submetido em:** 24/11/2015

**Instituição Proponente:** Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília

**Situação da Versão do Projeto:** Aprovado

**Localização atual da Versão do Projeto:** Pesquisador Responsável

**Patrocinador Principal:** FUNDAÇÃO DE APOIO À PESQUISA DO DISTRITO FEDERAL FAPDF

Comprovante de Recepção: PB\_COMPROVANTE\_RECEPCAO\_624426

**DOCUMENTOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Versão Atual Aprovada (PO) - Versão 1

Pendência Documental (PO) - Versão 1

Documentos do Projeto

Comprovante de Recepção - Submissão 3

Folha de Rosto - Submissão 3

Informações Básicas do Projeto - Subm

Orçamento - Submissão 3

Outros - Submissão 3

Projeto Detalhado / Brochura Investigad

TCLE / Termos de Assentimento / Justif

Apreciação 3 - UnB - Faculdade de Ciência

Projeto Completo

Tipo de Documento	Situação	Arquivo	Postagem	Ações
-------------------	----------	---------	----------	-------

**LISTA DE APECIAÇÕES DO PROJETO**

Apreciação	Pesquisador Responsável	Versão	Submissão	Modificação	Situação	Exclusiva do Centro Coord.	Ações
PO	Marina Mansur Ramagem	1	24/11/2015	02/02/2016	Aprovado	Não	⌂ ⌂ ⌂ ⌂

**HISTÓRICO DE TRÂMITES**

Apreciação	Data/Hora	Tipo Trâmite	Versão	Perfil	Origem	Destino	Informações
PO	02/02/2016 14:07:10	Parecer liberado	1	Coordenador	Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília - CEP/FS-UnB	PESQUISADOR	
PO	27/01/2016 14:55:38	Parecer do colegiado emitido	1	Coordenador	Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília - CEP/FS-UnB	Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília - CEP/FS-UnB	
PO	28/12/2015 13:05:50	Parecer do relator emitido	1	Membro do CEP	Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília - CEP/FS-UnB	Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília - CEP/FS-UnB	
PO	27/12/2015 12:34:23	Aceitação de Elaboração de Relatoria	1	Membro do CEP	Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília - CEP/FS-UnB	Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília - CEP/FS-UnB	
PO	09/12/2015 18:58:27	Confirmação de Indicação de Relatoria	1	Coordenador	Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília - CEP/FS-UnB	Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília - CEP/FS-UnB	
PO	09/12/2015 18:57:42	Indicação de Relatoria	1	Coordenador	Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília - CEP/FS-UnB	Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília - CEP/FS-UnB	
PO	09/12/2015 18:56:21	Retorno de Estado Efetuado	1	Coordenador	Em relatoria	Aguardando indicação de relatoria	indicar novo relator
PO	01/12/2015 19:42:01	Confirmação de Indicação de Relatoria	1	Coordenador	Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília - CEP/FS-UnB	Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília - CEP/FS-UnB	
PO	25/11/2015 10:45:02	Indicação de Relatoria	1	Secretária	Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília - CEP/FS-UnB	Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília - CEP/FS-UnB	
PO	25/11/2015 10:44:13	Aceitação do PP	1	Secretária	Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília - CEP/FS-UnB	Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília - CEP/FS-UnB	

Ocorrência 1 a 10 de 15 registro(s)

http://aplicacao.saude.gov.br/plataformabrasil/visao/pesquisador/gerirPesquisa/gerirPesquisaAgrupador.jsf

1/2