

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA – DOUTORADO
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: CLÍNICA INTEGRADA**

MARIANE APARECIDA SAVI SANSON

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* E *IN VIVO* DO EFEITO DE NANOPARTÍCULAS DE OURO
ESTABILIZADAS COM ÁCIDO ASCÓRBICO PARA CAPEAMENTO PULPAR**

**PONTA GROSSA
2020**

MARIANE APARECIDA SAVI SANSON

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* E *IN VIVO* DO EFEITO DE NANOPARTÍCULAS DE OURO
ESTABILIZADAS COM ÁCIDO ASCÓRBICO PARA CAPEAMENTO PULPAR**

Tese apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Doutor na Universidade Estadual de Ponta Grossa, no curso de Doutorado em Odontologia – Área de concentração em Clínica Integrada. Linha de pesquisa: Etiologia, diagnóstico e tratamento de doenças bucais.

Orientador: Prof. Dr. Fábio André dos Santos
Co-orientador: Prof. Dr. Michel Fleith Otuki

**PONTA GROSSA
2020**

S229 Sanson, Mariane Aparecida Savi
Avaliação *in vitro* e *in vivo* do efeito de nanopartículas de ouro estabilizadas com ácido ascórbico para capeamento pulpar / Mariane Aparecida Savi Sanson. Ponta Grossa, 2020.
125 f.

Tese (Doutorado em Odontologia - Área de Concentração: Clínica Integrada), Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientador: Prof. Dr. Fábio André dos Santos.
Coorientador: Prof. Dr. Michel Fleith Otuki.

1. Fluxometria por laser-doppler. 2. Capeamento da polpa dentária. 3. Nanopartículas metálicas. 4. Técnicas de cultivo de células. 5. Coloide de ouro. I. Santos, Fábio André dos. II. Otuki, Michel Fleith. III. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Clínica Integrada. IV.T.

CDD: 617.6

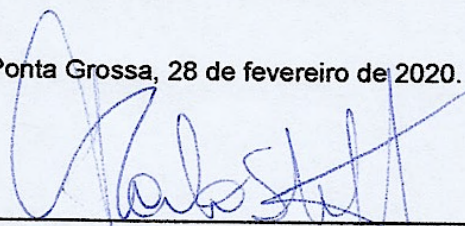
TERMO DE APROVAÇÃO

MARIANE APARECIDA SAVI SANSON

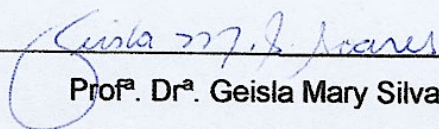
Avaliação *in vitro* e *in vivo* do efeito de nanopartículas de ouro estabilizadas com ácido ascórbico para capeamento pulpar direto.

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação Stricto sensu em Odontologia da Universidade Estadual de Ponta Grossa, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Odontologia, área de concentração em Clínica Integrada, linha de pesquisa de Etiologia, diagnóstico e tratamento das doenças bucais.

Ponta Grossa, 28 de fevereiro de 2020.



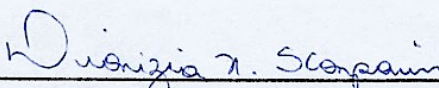
Prof. Dr. João Paulo Steffens
Universidade Federal do Paraná



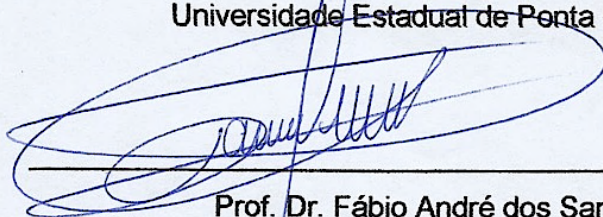
Profª. Drª. Geisla Mary Silva Soares
Universidade Federal do Paraná



Profª. Drª. Vanessa Migliorini Urban
Universidade Estadual de Ponta Grossa



Profª. Drª. Dionízia Xavier Scomparim
Universidade Estadual de Ponta Grossa



Prof. Dr. Fábio André dos Santos
Universidade Estadual de Ponta Grossa

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por dar-me serenidade e perseverança para realização do trabalho.

Ao Prof. Dr. Fábio André dos Santos por toda disponibilidade e motivação durante a realização deste trabalho, o qual sempre terei como exemplo, bem como por todos os conhecimentos transmitidos desde o curso de graduação.

Ao Prof. Dr. Michel Fleith Otuki por me apresentar a vasta linha de pesquisa na qual atuo até o momento e pelos ensinamentos desde o Mestrado.

Aos demais professores do Programa de Pós-graduação pela dedicação em contribuir com minha formação e de todos os discentes.

Às amigas e colegas de doutorado Daniela e Luisa, não apenas pelo trabalho conjunto no desenvolvimento dos experimentos, mas pelo companheirismo durante toda a caminhada.

Aos colegas de mestrado e doutorado, Lauro, Lurdes, Gustavo, Ana Cláudia, Tais, Leomar, Jéssica e Amanda pela amizade e momentos compartilhados.

Ao professor Vinícius M. Lenart pela dedicação em acompanhar o desenvolvimento do trabalho e pela contribuição técnica em etapas fundamentais da pesquisa.

Aos professores e colegas do laboratório M-55 de Biologia Celular pelo acolhimento e disponibilidade em utilizar os equipamentos de cultura celular, indispensáveis para a realização deste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Odontologia da Universidade Estadual de Ponta Grossa, juntamente com todos os seus servidores e professores pela estrutura e suporte durante todo o Mestrado e Doutorado.

Ao Complexo de Laboratórios Multiusuários (C-LABMU) da Universidade Estadual de Ponta Grossa pelo apoio técnico para a execução da pesquisa.

Ao William e familiares pela compreensão, pelo exemplo e pelo incentivo contínuo durante toda a carreira acadêmica.

E, finalmente, à Coordenação de Aperfeiçoamento de Nível Superior (CAPES) do Ministério da Educação e Cultura pelo apoio financeiro. Muito obrigada!

DADOS CURRICULARES

Mariane Aparecida Savi Sanson

NASCIMENTO 19.05.1991	Ponta Grossa, Paraná - Brasil
FILIAÇÃO	Vilma Savi Sanson Renato Sanson
2009 – 2013	Curso de Graduação em Odontologia pela Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG). Ponta Grossa – PR, Brasil.
2014 – 2016	Curso de Pós-Graduação em Odontologia. Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG) nível de Mestrado em Odontologia – Área de Concentração em Clínica Integrada. Ponta Grossa – PR, Brasil.
2017 – 2018	Curso de Especialização em Gestão em Saúde. Universidade Aberta do Brasil (UAB) e Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG) – Ponta Grossa – PR, Brasil.
2016 – em andamento	Curso de Pós-Graduação em Odontologia. Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG) nível de Doutorado em Odontologia – Área de Concentração em Clínica Integrada. Ponta Grossa – PR, Brasil.
2019 – em andamento	Professora Colaboradora das disciplinas de Clínica Integrada I, Mecanismos das Doenças I, Mecanismos das Doenças II e Microbiologia Experimental no Departamento de Odontologia da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG) – Ponta Grossa – PR.

RESUMO

Sanson, MAS. **Avaliação *in vitro* e *in vivo* do efeito de nanopartículas de ouro estabilizadas com ácido ascórbico para capeamento pulpar.** [Tese de Doutorado em Odontologia – Área de Concentração: Clínica Integrada]. Ponta Grossa: Universidade Estadual de Ponta Grossa; 2020.

Introdução: O capeamento pulpar direto é uma técnica que consiste na aplicação de um material diretamente sobre o tecido pulpar exposto, e tem por objetivo preservar a vitalidade do elemento dentário. As nanopartículas de ouro (AuNPs) podem contribuir para o tratamento da inflamação pulpar, devido a seu efeito antioxidante e anti-inflamatório. **Objetivo:** 1) caracterizar as AuNPs estabilizadas com ácido ascórbico e avaliar se apresentam efeito citotóxico e anti-inflamatório em cultura celular; 2) verificar se a fluxometria por laser-Doppler (FLD) permite o diagnóstico da condição pulpar em molares de ratos; e 3) avaliar se as AuNPs interferem no reparo pulpar em molares de ratos. **Material e métodos:** Estudo 1: Fibroblastos 3T3, macrófagos J774 e células indiferenciadas de polpa dental humana (CIPDH) foram tratados com diferentes concentrações de AuNPs por 24 e 48h, e analisada a viabilidade celular através do ensaio de MTT para as 3 linhagens e análise da morfologia celular para CIPDH. Em macrófagos, a resposta inflamatória foi induzida por lipopolissacarídeo (LPS), sendo quantificada a liberação de TNF- α (ELISA) após tratamento com as AuNPs. Estudo 2: Utilizando a fluxometria por laser-Doppler (FLD), foi aferido o fluxo sanguíneo pulpar (FSP) de primeiros molares superiores de 10 ratos por 2 diferentes operadores em 2 momentos com diferentes técnicas (sem e com guias), sendo determinado o método com melhor reprodutibilidade através da análise do coeficiente de variação e do teste de concordância de Bland-Altman juntamente com o teste t para uma amostra. Na sequência, foram criados modelos de necrose e inflamação pulpar em primeiros molares superiores de ratos (n=5), e os valores de FSP foram comparados com os achados histopatológicos a fim de obter a especificidade e sensibilidade do método para o diagnóstico de inflamação e necrose pulpar através da análise da curva ROC. Estudo 3: Foram realizadas exposições pulpares em primeiros molares superiores de ratos, as quais foram tratadas com: algodão estéril (controle, n=4), hidróxido de cálcio (n=4), e AuNPs (n=4) como material de capeamento e os dentes restaurados com resina composta por 21 dias. O FSP foi aferido periodicamente através de FLD, e a análise histopatológica considerou escores para severidade da inflamação, integridade do tecido pulpar e produção de barreira mineralizada. ANOVA com pós teste de Tukey foi empregado para comparação de dados numéricos paramétricos e o teste de Kruskal-Wallis seguido teste de comparações múltiplas de Dun para análise de escores. **Resultados:** As AuNPs não apresentaram efeitos citotóxicos sobre macrófagos J774, fibroblastos 3T3 e CIPDH. Entretanto, após 48h as CIPDH demonstraram alterações morfológicas indicativas de apoptose. Baixas concentrações de AuNPs regularam negativamente a liberação de TNF- α *in vitro* em macrófagos. A padronização do método de FLD indicou que aferições realizadas sem guias foram mais reprodutíveis. Os dentes com inflamação pulpar apresentaram um aumento nos valores de FSP de 48% e 52%, após 6h e 48h respectivamente. Em dentes com necrose pulpar os valores de FSP diminuíram 44% após 21 dias. A FLD apresentou boa especificidade (90%) e sensibilidade (100%) para o diagnóstico de necrose pulpar, no entanto, foi ineficiente para diferenciar a inflamação pulpar. No terceiro estudo, todos os materiais testados

para capeamento pulpar promoveram uma diminuição do FSP imediatamente após o procedimento, sendo que o FSP se reestabeleceu aos valores normais durante o período experimental, exceto no grupo CaOH, o qual manteve um decréscimo de 21% após 21 dias (n=4 por grupo). As AuNPs não promoveram controle da severidade da inflamação e não induziram a formação de matriz dentinária. **Conclusões:** As AuNPs apresentam atividade anti-inflamatória *in vitro*, não demonstrando efeito citotóxico sobre fibroblastos, macrófagos e células indiferenciadas de polpa dental humana. A FLD é capaz de diferenciar polpa vital e polpa não vital (necrose) em primeiros molares superiores de ratos, porém o método não foi sensível nem específico para diagnosticar a condição de inflamação pulpar. As AuNPs não apresentam benefício adicional na formação de dentina reparadora e no controle da intensidade da inflamação quando utilizadas isoladamente sobre o tecido pulpar exposto como material de capeamento.

Palavras-chave: fluxometria por laser-Doppler; capeamento da polpa dentária; nanopartículas metálicas; técnicas de cultivo de células; coloide de ouro.

ABSTRACT

Sanson, MAS. ***In vitro* and *in vivo* evaluation of the effect of ascorbic acid-coated gold nanoparticles for pulp capping.** [Tese de Doutorado em Odontologia – Área de Concentração: Clínica Integrada]. Ponta Grossa: Universidade Estadual de Ponta Grossa; 2020.

Introduction: Direct pulp capping is a technique that consists of applying a material directly on the exposed pulp tissue and aims to preserve the vitality of the dental element. Gold nanoparticles (AuNPs) can contribute to the treatment of pulp inflammation due to their antioxidant and anti-inflammatory effect. **Objective:** 1) To characterize ascorbic acid-coated AuNPs and evaluate if they present cytotoxic and anti-inflammatory effects in cell culture; 2) to verify if laser-Doppler flowmetry (LDF) allows the diagnosis of pulp condition in rat molars; and 3) to evaluate if AuNPs interfere with pulp repair in rat molars. **Material and methods:** Study 1: 3T3 fibroblasts, J774 macrophages and undifferentiated cells of human dental pulp (UCHDP) were treated with AuNPs for 24 and 48 hours, and cell viability was analyzed through the MTT assay for the 3 cell lines and cell morphology analysis for UCHDP. In macrophages, the inflammatory response was induced by LPS and the release of TNF- α was quantified (ELISA) after treatment with AuNPs. Study 2: Using laser-Doppler flowmetry (LDF) the pulpal blood flow (PBF) of the upper first molars of 10 rats was measured by 2 different operators at 2 times with different techniques (without and with guides), determining the method with better reproducibility through the analysis of the coefficient of variation and the Bland-Altman concordance test together with the t test for one sample. Then, models of pulp necrosis and inflammation in upper first molars of rats were created (n=5), and the PBF values were compared with the histopathological findings in order to obtain the specificity and sensitivity of the method for the diagnosis of inflammation and pulp necrosis through the analysis of ROC curve. Study 3: Pulp exposures were performed in the first molars of rats, which were treated with: sterile cotton (control), calcium hydroxide, and AuNPs for 21 days (n=4 per group). The PBF was measured periodically using LDF and the histopathological analysis considered scores for inflammation severity, pulp tissue integrity and mineralized barrier production. ANOVA with Tukey's post-test was used to compare parametric numerical data and the Kruskal-Wallis test followed by Dun's multiple comparisons test for score analysis. **Results:** AuNPs did not show cytotoxic effects on J774 macrophages, 3T3 fibroblasts and UCHDP. However, after 48h the UCHDP demonstrated morphological changes indicative of apoptosis. Low concentrations of AuNPs negatively regulate the *in vitro* release of TNF- α in macrophages. The standardization of the LDF method indicated that measurements taken without guides were more reproducible. Teeth with pulp inflammation showed an increase in PBF values of 48% and 52% after 6h and 48h, respectively. In teeth with pulp necrosis the PBF values decreased 44% after 21 days. LDF showed good specificity (90%) and sensitivity (100%) for the diagnosis of pulp necrosis, however, it was inefficient for the diagnosis of pulp inflammation. In the third study, all materials tested for pulp capping decreased PBF immediately after the procedure, with the PBF being restored to normal values during the experimental period, except in the CaOH group, which maintained a decrease of 21% after 21 days. AuNPs did not promote control of the severity of inflammation and did not induce the formation of a dentin matrix. **Conclusions:** AuNPs present anti-inflammatory activity *in vitro*, showing no cytotoxic effect on fibroblasts,

macrophages and UCHDP. LDF is able to differentiate vital pulp from non-vital pulp (necrosis) in upper first molars of rats, but the method was neither sensitive nor specific to diagnose pulp inflammation. AuNPs have no additional benefit in the formation of repair dentin and in controlling the inflammation when used alone on exposed pulp tissue as a capping material.

Keywords: laser-Doppler flowmetry; dental pulp capping; metal nanoparticles; cell culture techniques; gold colloid.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1	Representação esquemática dos mecanismos de ação anti-inflamatória e antioxidante das AuNPs.....	31
Figura 4.1	Processo de cultura primária de células indiferenciadas de polpa dental humana (CIPDH).....	40
Figura 4.2	Representação da distribuição dos diferentes tratamentos em placas de 96 poços.....	41
Figura 4.3	Processo de obtenção de moldeiras individuais para confecção das guias.....	44
Figura 4.4	Processo de moldagem individual e confecção as guias.....	45
Figura 4.5	Imagem final das guias e etapas de validação.....	46
Figura 4.6	Procedimento de exposição pulpar para indução de inflamação.....	48
Figura 5.1	A) Transmission electron microscopy of ascorbic acid-coated AuNPs. B) Particle size distribution. C) Aspect of AuNPs dispersion. D) Electron absorption spectrum in the UV-visible region.....	61
Figura 5.2	Viability percentages of 3T3 fibroblasts after treatment with different concentrations of ascorbic acid-coated AuNPs for 24h and 48h.....	61
Figura 5.3	Viability percentages of J774 macrophages after treatment with different concentrations of ascorbic acid-coated AuNPs for 24h and 48h.....	62
Figura 5.4	Viability percentages of Undifferentiated Cells of Human Dental Pulp (UCHDP) after treatment with different concentrations of ascorbic acid-coated AuNPs for 24h and 48h.....	62
Figura 5.5	UCHDP morphological analysis after 24h and 48h of AuNPs treatment and May Grünwald-Giemsa stain.....	63
Figura 5.6	LPS-induced TNF- α release in macrophages J774 treated with different concentrations of ascorbic acid-coated AuNPs.....	64
Figura 5.7	Intra-examiner agreemen analysis (examiner 1) of laser-Doppler flowmetry measurements obtained from first upper molars at 2 different times with a 7-day interval.....	83
Figura 5.8	Intra-examiner agreemen analysis (examiner 2) of laser-Doppler flowmetry measurements obtained from first upper molars at 2 different times with a 7-day interval.....	83

Figura 5.9	Inter-examiner agreemen analysis of laser-Doppler flowmetry measurements obtained from maxillary molars of rats at 2 different times 7-days interval.....	84
Figura 5.10	Pulp tissue blood flow variations in model of pulp inflammation during the experimental period.....	84
Figura 5.11	Pulp tissue blood flow variations in model of pulp necrosis during the experimental period.....	
Figura 5.12	Photomicrographs of pulp inflammation model after 24 hours and 48 hours. Hemotoxylin and Eosin-stained sections.....	86
Figura 5.13	Photomicrographs of pulp necrosis model after 14 days and 21 days. Hemotoxylin and Eosin-stained sections.....	87
Figura 5.14	ROC curve of laser-Doppler flowmetry for diagnosis of pulp inflammation and necrosis.....	88
Figura 5.15	Pulp blood flow values over the experiment period in groups treated with sterile cotton, calcium hydroxide anc ascorbic acid-coated AuNPs.....	104
Figure 5.16	Frequency distribution of histopathological analysis scores.....	105
Figure 5.17	Photomicrographs of pulp tissue response to direct pulp capping with sterile cotton after 7 days, 14 days and 21 days.....	106
Figure 5.18	Photomicrographs of pulp tissue response to direct pulp capping with calcium hydroxide after 7 days, 14 days and 21 days.....	107
Figure 5.19	Photomicrographs of pulp tissue response to direct pulp capping with ascorbic acid-coated AuNPs after 7 days, 14 days and 21 days.....	108

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1	Exemplo de tabela de contingência para análise da frequência da distribuição dos dados e análise da inter-relação entre o método teste (fluxometria por laser-Doppler) e o método padrão (diagnóstico histopatológico) para validação do método.....	51
Tabela 5.1	Example of contingency table used for test validation, through the analysis of the interrelation between the experimental method (laser-Doppler flowmetry) and the standard method (histopathological analysis)	81
Tabela 5.2	Mean, standard deviation and coefficient of variation of pulp flow values obtained by examiner 1, examiner 2 and both examiners by the different methods.....	82
Tabela 5.3	Frequency analysis of true/false positive/negative for pulp necrosis obtained by laser-Doppler flowmetry (LDF) compared to histopathological analysis.....	88

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3T3: linhagem de fibroblastos embrionários murinos (Swiss)

ANOVA: Análise de variância

AuNPs: Nanopartículas de ouro

CIPDH: Células Indiferenciadas de Polpa Dental Humana

DMEM: Meio de Eagle modificado por Dulbecco / Dulbecco's Modified Eagle's Medium

DMSO: Dimetilsulfóxido / *Dimethyl sulfoxide*

EDTA: Ácido etilenodiamino tetra-acético.

ELISA: Ensaio de imunoabsorção enzimática / *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

FBS: *Fetal Bovine Serum*

FLD: Fluxometria laser-Doppler

FSP: Fluxo sanguíneo pulpar

HE: Hematoxilina e Eosina

IL-1 β : interleucina 1 β

IL-8: interleucina 8

J774: Macrófagos murinos peritoneais

LDF: *Laser-Doppler Flowmetry*

LPS: Lipopolissacarídeo

LTA: Ácido lipoteicóico

MET: Microscopia Eletrônica de Transmissão

MMPs: Metaloproteinases de matriz

MTT: Brometo de tiazolil azul de tetrazólio / *Thiazolyl blue tetrazolium bromide*

NF- κ B: fator nuclear kappa B.

PBF: *Pulpal blood flow*

SFB: Soro Fetal Bovino

SPR: Ressonâncias Plasmônica de Superfície / *Surface Plasmon Resonance*

TEM: *Transmission Electron Microscopy*

TNF- α : Fator de necrose tumoral alfa

UCHDP: *Undifferentiated Cells of Human Dental Pulp*

UV-Vis: Ultravioleta visível

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	28
2.1	ALTERAÇÕES PULPARES	28
2.2	INFLAMAÇÃO NO REPARO PULPAR	21
2.3	CAPEAMENTO PULPAR.....	23
2.4	FLUXOMETRIA POR LASER-DOPPLER NAS ALTERAÇÕES PULPARES.....	23
2.5	NANOPARTÍCULAS DE OURO.....	25
3	PROPOSIÇÃO.....	31
3.1	OBJETIVOS GERAIS.....	31
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	31
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	33
4.1	ESTUDO 1.....	33
4.1.1	<i>Síntese das AuNPs.....</i>	<i>33</i>
4.1.2	<i>Microscopia Eletrônica de Trasmissoão.....</i>	<i>34</i>
4.1.3	<i>Espectroscopia de absorção no Ultravioleta-Visível (UV-Vis)</i>	<i>34</i>
4.1.4	<i>Potencial Zeta.....</i>	<i>34</i>
4.1.5	<i>Cultura de células – 3T3, J774 e cultura primária de células indiferenciadas de polpa dental humana.....</i>	<i>34</i>
4.1.6	<i>Tratamentos.....</i>	<i>36</i>
4.1.7	<i>MTT para análise da viabilidade celular.....</i>	<i>37</i>
4.1.8	<i>Análise morfológica pela coloração de May-Grunwald Giemsa.....</i>	<i>37</i>
4.1.9	<i>Produção de TNF-α em macrófagos estimulados por LPS.....</i>	<i>38</i>
4.1.10	<i>Análise estatística.....</i>	<i>38</i>
4.2	ESTUDO 2.....	38
4.2.1	<i>Delineamento experimental.....</i>	<i>38</i>
4.2.2	<i>Confecção e validação das guias.....</i>	<i>40</i>
4.2.3	<i>Fluxometria por laser-Doppler de primeiros molares superiores de ratos para validação do método.....</i>	<i>42</i>
4.2.4	<i>Modelos de inflamação e necrose pulpar.....</i>	<i>43</i>
4.2.5	<i>Fluxometria por laser-Doppler em molares com inflamação e necrose pulpar.....</i>	<i>44</i>
4.2.6	<i>Eutanásia dos animais e coleta das amostras.....</i>	<i>45</i>
4.2.7	<i>Análise histológica.....</i>	<i>45</i>
4.2.8	<i>Análise estatística para padronização do método</i>	<i>45</i>
4.2.9	<i>Análise do poder discriminativo da fluxometria por laser-Doppler para diagnóstico pulpar</i>	<i>46</i>
4.3	ESTUDO 3.....	47
4.3.1	<i>Delineamento experimental.....</i>	<i>47</i>
4.3.2	<i>Exposição pulpar e aplicação dos tratamentos.....</i>	<i>48</i>
4.3.3	<i>Fluxometria por laser-Doppler da microvascularização pulpar.....</i>	<i>48</i>
4.3.4	<i>Eutanásia dos animais e coleta das amostras.....</i>	<i>49</i>
4.3.5	<i>Análise histológica.....</i>	<i>49</i>

4.3.6	<i>Análise estatística</i>	50
5	ARTIGOS	51
5.1	ARTIGO 1: ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITY AND BIOCOMPATIBILITY OF ASCORBIC ACID-COATED GOLD NANOPARTICLES IN PRIMARY CULTURE OF UNDIFFERENTIATED CELLS OF HUMAN DENTAL PULP.....	51
5.2	ARTIGO 2: VALIDATION OF THE LASER-DOPPLER FLOWMETRY METHOD FOR DIAGNOSIS OF PULP INFLAMMATION AND NECROSIS ON MAXILLARY FIRST MOLARS OF RATS.....	68
5.3	ARTIGO 3: EFFECT OF TOPICAL APPLICATION OF ASCORBIC ACID-COATED GOLD NANOPARTICLES IN RAT TEETH SUBMITTED TO PULP EXPOSURE.....	90
6	DISCUSSÃO	110
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	114
	REFERÊNCIAS	115
	ANEXO A: CARTA DE APROVAÇÃO DA CEUA	125

1 INTRODUÇÃO

A necessidade clínica de se realizar um capeamento pulpar ocorre em resposta a uma lesão de cárie que se estendeu profundamente, a traumas ou em casos de exposição pulpar acidental durante intervenções clínicas, buscando a recuperação da integridade do tecido pulpar, mantendo sua vitalidade.¹ Isso implica que agressões físicas, químicas ou biológicas sobre o tecido pulpar, como a ação de instrumentos rotatórios, e a difusão de agentes químicos dos materiais dentários e subprodutos bacterianos nos túbulos dentinários, podem desencadear eventos inflamatórios e imunológicos na polpa dentária subjacente.²

Caso as injúrias teciduais não sejam removidas com tratamentos clínicos eficientes, a resposta inflamatória será intensificada adquirindo características crônicas, levando ao desenvolvimento de uma pulpite irreversível, fibrose colágena e envelhecimento prematuro do tecido, culminando com a necrose tecidual e até mesmo desenvolvimento de abscessos. Nestes casos, a estrutura dentária perde sua vitalidade pulpar e intervenções mais invasivas tornam-se necessárias, como o tratamento endodôntico.¹⁻³

A reação inflamatória parece ser um pré-requisito para a atração de células progenitoras, sua diferenciação em odontoblastos e consequente deposição de uma barreira de tecido mineralizado, desde que a inflamação seja leve e a contaminação bacteriana seja limitada.^{1,2} A contaminação do tecido pulpar também é um fator crítico para o sucesso do tratamento. O processo de reparação nunca ocorre na presença de uma infecção crônica de longa duração, o que resulta sempre na necrose da polpa devido à resposta inflamatória intensa. Portanto, existe um limite aceitável de infecção e inflamação pulpar difícil de ser determinado clinicamente. Na maioria dos casos, é o sucesso ou o fracasso do capeamento que irá fornecer a resposta.^{1,2} Assim, o controle da intensidade e duração da resposta inflamatória na polpa dentária é um fator crítico para garantir o sucesso das terapias conservadoras, como o capeamento pulpar direto.¹

A previsibilidade do sucesso clínico do tratamento de capeamento pulpar é limitada, pois mesmo com a grande quantidade de materiais disponíveis, estes nem sempre são capazes de limitar a resposta inflamatória pulpar e estimular a formação de uma barreira mineralizada. O hidróxido de cálcio foi inserido na Odontologia por Hermannin em 1920,⁴ considerado por muito tempo como o padrão ouro para o

capeamento pulpar direto,^{1,5-7} persistindo até hoje como um dos materiais mais utilizados para a terapia de polpas vitais.⁸ Entretanto, apesar do hidróxido de cálcio permitir o reparo pulpar controlando o processo inflamatório e estimulando a formação de uma barreira de tecido mineralizado, esta barreira pode se apresentar fina, irregular e permeável, com comunicações que permitem a re-contaminação do tecido pulpar,^{5,9} sendo comuns casos de inflamação recorrente e necrose pulpar.¹⁰ Apesar da grande variedade de materiais sugeridos para o capeamento da polpa, como o MTA, fosfato tricálcio e hidroxiapatita, ainda faltam evidências sobre o material mais adequado e com resultados mais previsíveis e duradouros.¹¹ Desta forma, ainda é importante o desenvolvimento de novos materiais que possam otimizar o controle da inflamação e induzir a formação de tecido reparador mineralizado com melhores propriedades estruturais, tornando o resultado do processo mais previsível.

Entre os materiais com potencial de ser empregado para o tratamento de condições inflamatórias é possível destacar as nanopartículas de ouro (AuNPs), as quais são investigadas pelo nosso grupo de pesquisa desde 2015. Evidências apontam seu efeito anti-inflamatório,¹²⁻¹⁴ antioxidante,^{13,15} antimicrobiano^{16,17} e inibidor de metaloproteinases de matriz,¹⁸ sendo discutida sua aplicação em materiais odontológicos.¹⁸ Como a inflamação do tecido pulpar tem um papel crítico no prognóstico de terapias pulpares conservadoras, utilizar o modelo de tratamento de exposições pulpares torna-se interessante para avaliar o efeito anti-inflamatório das AuNPs. Porém, ainda não foram conduzidos estudos *in vivo* a respeito da aplicação de AuNPs especificamente sobre o tecido pulpar exposto.

Desta forma, pesquisas que avaliem o efeito de AuNPs no tratamento de condições inflamatórias pulpares tornam-se justificáveis e promissoras, em especial quando o ácido ascórbico é utilizado em seu processo de síntese, o qual apresenta propriedades antioxidantes, além de ser utilizado *in vitro* como fator de indução de mineralização.¹⁹ Ademais, alterações no processo de síntese, podem produzir AuNPs de diferentes formatos, tamanhos e concentrações, o que interfere em sua capacidade de atravessar membranas celulares e consequentemente em sua citotoxicidade, sendo fundamental sua avaliação *in vitro*.

A avaliação do sucesso clínico do capeamento pulpar depende muito da resposta sintomatológica do paciente em testes de sensibilidade pulpar ao frio ou calor. Em animais geralmente a análise histopatológica é que determina o diagnóstico da condição pulpar. O emprego de técnicas que permitam avaliar diretamente a

condição pulpar de vitalidade pulpar, bem como a microvascularização do tecido e diagnosticar quadros inflamatórios da polpa em tempo real, é de grande contribuição para o âmbito da pesquisa em animal.

A fluxometria por laser-Doppler (FLD) é uma técnica utilizada para aferição do fluxo sanguíneo da microvascularização de tecidos biológicos, podendo-se adotar modelos de medição de perfusão sanguínea não invasivos.^{20,21} A incidência de uma luz coerente guiado por uma fibra óptica durante a FLD^{20,22} permite a verificação de valores de fluxo sanguíneo, velocidade de fluxo e concentração média de hemácias.²²⁻²⁴ Assim, a FLD apresenta ampla aplicação na endodontia como método de diagnóstico de vitalidade pulpar, visto que analisa o componente vascular do dente, ao invés de avaliar apenas respostas relacionadas à condição das fibras nervosas, como os testes térmicos e elétricos de sensibilidade pulpar.²²

Diversos estudos clínicos utilizam a FLD para avaliação do fluxo sanguíneo pulpar (FSP) em dentes de pacientes,^{21,25-27} bem como em estudos da microvascularização de incisivos inferiores de ratos.^{28,29} Porém, como os incisivos dos ratos apresentam características singulares de um animal roedor, isto dificulta a extrapolação dos resultados. Assim, muitos estudos utilizam os molares de ratos para avaliação da biocompatibilidade de materiais de capeamento pulpar,³⁰ na tentativa de se aproximar da condição encontrada em seres humanos.^{31,32} Entretanto, ainda se faz necessário o estabelecimento de um protocolo para FLD em polpa de molares de ratos que seja reprodutível, sensível e específico.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 ALTERAÇÕES PULPARES

A polpa é um tecido conjuntivo frouxo originalmente estéril, com um componente celular heterogêneo. Histologicamente apresenta uma camada contínua de odontoblastos na periferia que estabelecem uma relação funcional e estrutural com a dentina, sendo as células responsáveis pela produção da matriz dentinária, a qual reveste e protege o tecido pulpar. A matriz de colágeno e glicoproteínas produzidas por fibroblastos conferem estrutura ao tecido. Além do componente vascular e sensorial, células imunocompetentes também estão presentes, especialmente macrófagos, linfócitos T e células dendríticas. Células tronco latentes (progenitoras) atuam no processo de auto-renovação tecidual, podendo contribuir com o reparo tecidual e mineralização após agressões.^{2,33}

Estímulos físicos, químicos e biológicos desencadeiam respostas inflamatórias e imunológicas, que, dependendo de sua intensidade, promovem desde o reparo do tecido com a produção de dentina reacional e reparadora, até mesmo quadros de pulpíte irreversível, fibrose e necrose tecidual,³⁴ levando à perda da vitalidade do elemento dentário e consequente necessidade de tratamento endodôntico. Estudos demonstram que processos de reparo pulpar se desenvolvem mais adequadamente em resposta a agressões de baixa intensidade, como cáries de lento desenvolvimento, enquanto agressões abruptas ou de rápido desenvolvimento promovem um ambiente rico em mediadores inflamatórios e em atividade celular, o que pode desenvolver um quadro inflamatório crônico, inibindo respostas regenerativas do tecido pulpar e estimulando a morte celular.^{35,36}

Os odontoblastos têm atuação constante na defesa do tecido pulpar, sendo as primeiras células a ter contato com agressões bacterianas, reconhecendo-as através de receptores do tipo Toll (TLRs).^{37,38} A ativação de tais receptores estimula a produção de componentes da resposta imune inata e adaptativa, levando à expressão de citocinas e quimiocinas.³⁹ Estes receptores estão envolvidos no reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), como o ácido lipoteicóico (LTA), via TLR2, e o lipopolissacarídeo (LPS), via TLR 4, constituintes da parede celular de bactérias Gram-positivas e negativas, respectivamente.^{2,40,41} O reconhecimento de antígenos via TLRs, ou até mesmo a ação de citocinas

inflamatórias, promove a ativação da via de transcrição do fator nuclear kappa B (NF- κ B), podendo induzir a expressão de genes determinados, desencadeando a transcrição de RNAm para produção de diferentes mediadores inflamatórios pela célula.⁴⁰⁻⁴²

A ativação de odontoblastos através do LTA induz a síntese de baixas concentrações de quimiocinas, como CCL2 e CXCL10, responsáveis pelo recrutamento de células dendríticas e linfócitos T, respectivamente.⁴³ Ainda, odontoblastos desafiados pelo LTA diminuem a expressão de componentes da matriz dentinária como colágeno tipo I e sialofosfoproteína de dentina,³⁸ ocorrendo efeito semelhante com a estimulação de odontoblastos pelo LPS.⁴⁴

Ainda não se sabe como, mas os odontoblastos respondem de maneira diferente a altas e baixas doses de componente bacterianos, em que cáries de desenvolvimento lento são possivelmente mais favoráveis a deposição de dentina reacional pelos odontoblastos.² Em processos cariosos lentos, abrasão patológica, ou o preparo cavitário superficial realizado pelo dentista, os odontoblastos se mantêm vivos e respondem aos estímulos com a produção de dentina reacional, podendo ser mais ou menos semelhante à dentina fisiológica (tubular).⁴⁵

As células dendríticas e odontoblastos mantêm uma íntima relação durante o processo de defesa pulpar. Moléculas quimiotáticas liberadas pelos odontoblastos são responsáveis pelo recrutamento de células dendríticas, formando um rápido acúmulo de células dendríticas próximo a camada de odontoblastos durante a fase inicial do reparo pulpar, atuando como uma “vigilância imunológica”. Por outro lado, estudos sugerem que as células dendríticas desempenham importante papel na diferenciação de odontoblastos e modulação de sua atividade de síntese.^{2,3}

Em processos cariosos invasivos ou na exposição pulpar, os odontoblastos são destruídos pela ação de toxinas bacterianas ou alterados pelas moléculas tóxicas liberadas pelos materiais restauradores, ou por enzimas liberadas pela degradação da matriz extracelular. Neste caso, odontoblastos tornam-se incapazes de realizar o reparo e produção de dentina reacional. Assim, um processo inflamatório local é estimulado recrutando células tronco ou progenitoras presentes na polpa. Elas se proliferam e se diferenciam em células semelhantes a osteoblastos ou odontoblastos,^{46,47} produzem matriz extracelular, a qual se mineraliza formando uma fina ponte dentinária capaz de ocluir o sítio da exposição, a qual se assemelha ao osso (osteodentina) chamada de dentina reparadora.^{2,46} Uso de materiais capeadores

procura estimular a produção de dentina reacional ou reparadora e controlar a resposta inflamatória local.

A exposição pulpar permite o contato direto do tecido à ação de microrganismos, e em cavidades profundas, promovidas por lesões ativas de cárie ou pelo preparo cavitário, ocorre a difusão de subprodutos bacterianos e agentes químicos de materiais odontológicos pelos túbulos dentinários, os quais apresentam-se com maior diâmetro nas proximidades com o tecido pulpar, desencadeando uma resposta imunológica na polpa subjacente.² Desta forma, é fundamental proteger o tecido pulpar que ainda esteja íntegro nestas situações. Caso não seja realizada uma intervenção, a difusão de produtos bacterianos e de materiais dentários estimula uma resposta inflamatória intensa, caracterizando o quadro de pulpíte irreversível.

A inflamação pulpar induz vasodilatação das arteríolas e aumento da permeabilidade capilar, promovendo uma queda na resistência vascular e, portanto, aumenta o fluxo sanguíneo. Além disso, o aumento da permeabilidade capilar, aumenta a pressão osmótica coloidal no fluido tecidual, o que contribui para uma maior transferência de fluido da corrente sanguínea para o tecido. Isso pode promover o aumento do volume do fluido intersticial e, assim, aumentar a pressão do fluido intersticial na área inflamada. A magnitude do aumento da pressão tecidual local dependerá da distensibilidade do espaço intersticial. Tecidos com uma capacidade de distensão muito baixa como o tecido pulpar, por estar acondicionado num espaço restrito circundado pela dentina rígida, apresentará um aumento pronunciado na pressão dos tecidos. O aumento da pressão tecidual tenderá a comprimir as veias de paredes finas e assim aumentar a resistência vascular venosa. O aumento da resistência vascular venosa irá reduzir o fluxo sanguíneo, podendo causar estase sanguínea, resultando na isquemia e necrose dos tecidos.⁴⁸

Desta forma, o fato do tecido conjuntivo pulpar apresentar uma capacidade limitada de edema, associado a um pobre sistema de drenagem, predispõe ao desenvolvimento de dor intensa em quadros inflamatórios pela compressão dos tecidos.^{35,36}

Análises histológica do tecido pulpar inflamado apontam um pequeno número de mastócitos, ou até mesmo sua ausência.^{49,50} Esta escassez de mastócitos do tecido pulpar pode interferir no mecanismo de defesa pulpar, tendo em vista que atuam como células imunorreguladoras pela produção de aminas vasoativas e citocinas, porém auxilia na modulação da intensidade da resposta inflamatória, tendo

em vista que a degranulação maciça de aminas vasoativas promoveria uma intensa vasodilatação e recrutamento de células inflamatórias, com consequente aumento da pressão intrapulpar e necrose do tecido.⁵¹

2.2 INFLAMAÇÃO NO REPARO PULPAR

Durante muito tempo a inflamação do tecido pulpar foi vista como uma reação indesejável, podendo levar a destruição tecidual, e seu papel no processo de reparo pulpar foi subestimado.^{2,52} Entretanto, esta parece ser uma visão extremamente simplista do processo de defesa pulpar, o qual é complexo e ainda não compreendido integralmente. A reação inflamatória, em especial a liberação de citocinas como IL-1 β e IL-8 por neutrófilos,⁵³ parece ser um pré-requisito para a atração de células progenitoras, sua diferenciação em odontoblastos e consequente deposição de uma barreira de tecido mineralizado, desde que a inflamação seja leve e a contaminação bacteriana seja limitada.^{1,2} Odontoblastos que são estimulados durante a agressão pulpar via TLRs (reconhecendo padrões moleculares associados a patógenos e padrões moleculares associados a danos) liberam citocinas no tecido pulpar que irão auxiliar na inflamação e no recrutamento de células para o reparo do tecido.^{54,55}

A resposta inflamatória local ocorre a fim de eliminar possíveis antígenos, e permitir que o reparo ocorra em um ambiente adequado. Entretanto, o processo de reparo só ocorre efetivamente após a resolução da resposta inflamatória.^{2,56} Assim, estudos que investiguem os eventos celulares e moleculares iniciais que levam ao reparo pulpar auxiliarão no desenvolvimento de materiais ideais para promoção do reparo pulpar.²

2.3 CAPEAMENTO PULPAR

O procedimento de capeamento pulpar consiste na aplicação de um material de proteção diretamente sobre o tecido pulpar exposto, ou indiretamente, sobre a parede de fundo de cavidades profundas na iminência da exposição. Desta forma, uma barreira física é utilizada para selar a região exposta, impedir a entrada de microrganismos e suas toxinas e estimular a formação de uma nova barreira de tecido mineralizado. A aplicação de um material de capeamento pulpar promove uma resposta inflamatória local, de maneira controlada, recrutando células do tecido

pulpar, as quais se proliferam e diferenciam em células semelhantes a odontoblastos que produzem uma matriz extracelular que serve como arcabouço para a formação de uma ponte mineralizada de dentina reparadora.⁵⁷

Atualmente, existe uma variedade de opções de materiais que podem ser utilizados para o capeamento da polpa, entretanto, ainda é discutível qual o material mais adequado, que promova os resultados mais previsíveis e duradouros.¹¹

O hidróxido de cálcio, introduzido na prática odontológica em 1920 por Hermannin,⁴ é o material classicamente empregado para a proteção do tecido pulpar pela técnica do capeamento, sendo considerado por muito tempo como o padrão ouro, para este tipo de tratamento.^{1,5-7} O hidróxido de cálcio é capaz de controlar o processo inflamatório e estimular a formação de uma barreira de tecido mineralizado em resposta do seu pH alcalino, que promove uma cicatriz de necrose por coagulação superficial no tecido pulpar.⁹ Desta forma, por muitos anos o hidróxido de cálcio foi o material de escolha para tratamento de exposições pulpares. Entretanto, a barreira de dentina reparadora neoformada é fina e irregular, apresentando lacunas e remanescentes pulpares aprisionados, o que comumente permite a recontaminação do tecido pulpar.^{5,9,10} Ademais, estudos trazem a hipótese de uma redução do potencial de resposta de reparo do tecido pulpar a agressões subsequentes após o capeamento pulpar com hidróxido de cálcio, devido à diminuição do tamanho da câmara pulpar promovida pela indução de calcificações ectópicas.⁹

A fim de superar estas dificuldades, outros materiais foram propostos para o capeamento do tecido pulpar exposto, podendo-se destacar o agregado trióxido mineral (MTA), composto por silicato tricálcico, silicato di-cálcio, aluminato tricálcico, di-hidrato de sulfato de cálcio e óxido bismuto.⁵⁸ É crescente o número de evidências que apontam para a eficiência do MTA como material de capeamento pulpar direto,^{1,59} apresentando biocompatibilidade, atividade antimicrobiana, selamento adequado e excelentes propriedades físico-químicas.^{60,61} Uma revisão sistemática publicada em 2015 concluiu que o MTA apresenta maior taxa de sucesso clínico em comparação ao hidróxido de cálcio no capeamento pulpar direto, podendo substituir de maneira eficiente o hidróxido de cálcio nesta função.⁶² Entretanto, algumas limitações do MTA dificultam sua ampla utilização pelos dentistas, como o alto custo, o difícil manuseio, o tempo de presa longo, a instabilidade do pó após aberto e o potencial de promover descoloração do dente.⁵⁸

Dentre as opções que buscaram superar essas limitações, destaca-se um novo cimento a base de silicato de cálcio, o Biodentine, o qual também tem se apresentado como um excelente material de capeamento pulpar,⁶³ estimulando a formação de dentina repradora e mantendo o tecido adjacente vital, alcançando taxas de sucesso de 83% após 6 meses.⁶⁴ Este material trouxe as indicações e vantagens semelhantes ao MTA, porém com tempo de endurecimento mais curto, além de poder ser empregado diretamente sobre o tecido exposto tanto como um material de proteção pulpar como de preenchimento da cavidade. Entretanto, esta ainda é uma opção de custo elevado.

A nano-hidroxiapatita também tem sido proposta para o capeamento pulpar direto devido a sua habilidade de induzir a formação de uma ponte dentinária completa, favorecendo respostas celulares e vasculares.⁶⁵ Novos materiais como o própolis também foi proposto, o qual pode apresentar resultados semelhantes ao hidróxido de cálcio, porém com uma maior taxa de produção de dentina tubular, com maior grau de organização.⁶⁶ Entretanto, apesar de promissores, esses novos materiais são menos explorados na literatura.

Mesmo frente à diversidade de opções disponíveis e diariamente investigadas, o hidróxido de cálcio ainda persiste como um dos materiais mais utilizados para terapia de polpas vitais.⁸ Apesar do capeamento pulpar direto ser um procedimento rotineiramente empregado na clínica odontológica, muitas vezes os desfechos clínicos são pouco previsíveis, sendo comum casos de inflamação recorrente e necrose pulpar após o capeamento pulpar.¹⁰ Desta forma, o insucesso clínico do capeamento pulpar verificado em alguns casos incentiva a busca por novas opções terapêuticas, que possam promover resultados mais previsíveis.²

2.4 FLUXOMETRIA POR LASER-DOPPLER NAS ALTERAÇÕES PULPARES

Habitualmente, a avaliação do sucesso do capeamento pulpar em manter a vitalidade do tecido ocorre pelo acompanhamento do desfecho clínico do quadro. Busca-se clinicamente que os pacientes se apresentem assintomáticos, sem relatos de dor espontânea, ausência de alterações periapicais no exame radiográfico, e que respondam adequadamente aos estímulos térmicos, como o teste de sensibilidade pulpar ao gelado. Basicamente, o relato do paciente e os resultados dos testes clínicos e radiográficos são mandatórios.⁶⁷ Porém, definir com precisão o estado de saúde da

polpa dentária ainda é um desafio clínico importante.⁶⁸ Os testes de sensibilidade pulpar comumente empregados, apesar de fornecerem informações importantes para o diagnóstico quando utilizado por um clínico experiente, nem sempre refletem a característica real do tecido por se basearem apenas na resposta do paciente ao estímulo, estando sujeitos a erros.⁶⁸

No âmbito da pesquisa em animal, a análise histopatológica do tecido pulpar ainda é o parâmetro mais utilizado. Entretanto, por se tratar de um processo destrutivo da amostra, só é possível obter uma análise transversal da condição pulpar no final do período experimental. Ademais, as características histológicas nem sempre se relacionam com a condição clínica pulpar.⁶⁷

Assim, o emprego de uma técnica que permita obter um resultado em tempo real com o animal vivo, que possibilite diversas aferições da mesma amostra em períodos diferentes, e que não dependa da resposta sintomatológica do animal é o ideal para determinar o diagnóstico da condição pulpar. Como as alterações inflamatórias e necróticas pulpares estão intimamente relacionadas com alterações na microvascularização deste tecido,^{48,69} é fundamental utilizar uma técnica que permita avaliar diretamente a condição pulpar de vitalidade pulpar através da análise da sua microvascularização em tempo real, permitindo diagnosticar quadros inflamatórios e necróticos da polpa.

A fluxometria por laser-Doppler (FLD) é uma técnica utilizada para aferição do fluxo sanguíneo da microvascularização de tecidos biológicos, podendo-se adotar modelos de medição de perfusão sanguínea não invasivos.^{20,21} Assim, a utilização da FLD pode ser considerada como padrão ouro no diagnóstico de vitalidade pulpar em endodontia, por permitir monitorar a microvascularização pulpar, diagnosticando casos de polpa dental necrótica.⁶⁸

Muitos estudos em modelos animais avaliam a presença ou ausência de vitalidade pulpar como desfecho, como pesquisas que buscam novos tratamentos para capeamento pulpar, efeito de movimentações ortodônticas, novos materiais adesivos ou restauradores.^{28,29} Assim, o emprego da FLD em animais seria de grande contribuição para pesquisa animal que busca investigar materiais odontológicos de uso na Dentística e Endodontia.

A técnica da FLD consiste na utilização de uma fibra óptica pela qual é incidida uma luz coerente sobre o tecido biológico, a qual pode ser absorvida, transmitida, refletida ou dispersa. No caso da luz ser dispersada por partículas que estão em

movimento, como glóbulos vermelhos, isso levará a uma alteração na frequência da luz dispersada em comparação a luz incidente, proporcional à velocidade desse movimento, conhecido como o efeito Doppler.^{20,22} Essa luz dispersada é detectada por outra fibra óptica e guiada até o fotodetector do aparelho, convertendo essa radiação em sinais elétricos, que são processados e apresentados em valores de fluxo sanguíneo, velocidade de fluxo e concentração média de hemácias em unidades arbitrárias próprias do equipamento.²²⁻²⁴

Diversos estudos clínicos utilizaram a FLD para avaliação do fluxo sanguíneo na micro-vascularização de polpa dentária de pacientes.^{21,25-27} Na pesquisa animal a FLD também foi utilizada para avaliação da micro-vascularização pulpar em incisivos mandibulares de ratos.^{28,29} Apesar do melhor acesso e maior simplicidade da técnica durante a aferição da FLD em incisivos de ratos, estes dentes apresentam características singulares de um animal roedor, como o contínuo processo de erupção permitido pela presença permanente de ameloblastos promovendo a formação de esmalte. Portanto, essas características dificultam a extrapolação dos resultados obtidos em incisivos de ratos, pensando na sua aplicabilidade em humanos. Assim, muitos estudos utilizam os molares de ratos, que apresentam processo de erupção limitado, na tentativa de se aproximar ao máximo da condição encontrada em seres humanos,^{31,32} especialmente no estudo de materiais utilizados em terapias pulpares conservadoras que dependem de uma resposta do tecido para promover o reparo. Entretanto, poucos estudos utilizam a FLD para avaliar desfecho pulpar em molares de ratos,⁷⁰ além de apresentarem uma breve descrição da técnica, dificultando sua reprodução. Devido à grande sensibilidade da técnica, onde pequenos desvios de posicionamento e estabilidade da sonda promovem grandes alterações de valores, podendo culminar falsos resultados,⁷¹ ainda se faz necessário o estabelecimento de um protocolo para FLD de polpa de molares de ratos que seja reprodutível e que proporcione sensibilidade e especificidade adequadas para o diagnóstico de inflamação e necrose pulpar.

2.5 NANOPARTÍCULAS DE OURO

A duração da resposta inflamatória durante a inflamação pulpar é um fator chave para determinar o sucesso do reparo tecidual com a aplicação de terapias

pulpaes conservadoras.¹ Assim, torna-se importante o uso de materiais que controlem a intensidade da resposta e estimulem assim as etapas regenerativas do processo.

No campo da nanotecnologia, as nanopartículas de ouro tem se destacado na literatura devido às suas propriedades físico químicas, simplicidade no processo de síntese e aplicações biomédicas.⁷² As AuNPs podem ser utilizadas para marcação de células e tecidos com a finalidade diagnóstica, para carreamento de biomoléculas para dentro das células além de serem utilizadas como terapia anti-câncer pelo processo de hipertermia, atingindo células sensíveis a pequenos aumentos de temperatura.⁷³ Dentre todas as suas propriedades, destacam-se sua atividade anti-inflamatória e antioxidante (figura 2.1), podendo ser empregadas em diversas condições inflamatórias.¹²⁻¹⁴

O mecanismo envolvido na ação anti-inflamatória das AuNPs abrange sua interferência na ativação do NF- κ B, o qual trata-se de um complexo proteico que atua como fator regulador da transcrição gênica, promovendo diferentes padrões de resposta. O NF- κ B encontra-se em sua forma citoplasmática em complexo com proteínas inibitórias (I κ Bs), as quais desempenham o papel de controle da atividade do NF- κ B. A ligação de citocinas ou reconhecimento de antígenos a superfície de células inflamatórias induz a degradação da I κ B- α por enzimas I κ B-quinases, expondo a sequência sinal de localização nuclear do NF- κ B permitindo a migração desse fator para o núcleo. Durante uma resposta inflamatória, isso induz a expressão de genes determinados, desencadeando a transcrição de RNAm para produção de diferentes mediadores inflamatórios.^{40,42} As AuNPs atuam diminuindo a atividade de transcrição de citocinas pró-inflamatórias limitando a ativação da via pró-inflamatória do NF- κ B. Este fenômeno ocorre através da inibição de I κ B-quinases, as quais são responsáveis pela ativação do NF- κ B pela degradação de sua porção inibitória.^{12,74-76} Além disso, estudos apontam uma interação extracelular estrutural das AuNPs com moléculas de IL-1 β , as a quais se agregam ao redor das AuNPs, impedindo-as de se ligar aos receptores e regulando negativamente as respostas celulares inflamatórias tanto *in vitro* como *in vivo*.¹⁴

As AuNPs também apresentam capacidade antioxidante através da interação direta com espécies reativas de oxigênio (EROs). A resposta inflamatória predispõe a um ambiente de estresse oxidativo, gerado pelo aumento da formação de EROs por

células de polpa dental, evidenciada pela diminuição da taxa de morte de células de polpa dental humana incubadas com o fungo.¹⁶

O uso de nanopartículas de ouro em materiais odontológicos tem sido discutido devido ao seu efeito de inibição de metaloproteinases de matriz (MMPs), como a MMP-8 e MMP-9, as quais atuam na hidrólise de fibrinas de colágeno promovendo a degradação da interface adesiva em restaurações.¹⁸ Ademais, é conhecido o papel das MMPs na degradação da estrutura colágena da matriz extracelular, destruição tecidual e propagação da lesão pulpar, assim como em qualquer outro tecido inflamado, participando do processo de pulpite reversível e irreversível.⁸⁴ Produtos bacterianos sobre o tecido pulpar estimulam células polimorfonucleares (PMN) a produzirem MMP-8, as quais participam da destruição tecidual durante a necrose pulpar e abscesso.⁸⁴

A partir do conhecimento das diferentes propriedades das AuNPs torna-se justificável e promissor investigar o efeito desse nanomaterial sobre o tecido pulpar exposto. Dentre as nanopartículas metálicas, as de ouro são as mais comumente estudadas, devido à biocompatibilidade e suas propriedades ópticas singulares que facilitam sua caracterização e simplicidade do processo de síntese.^{72,85} O método mais comum de se obter o ouro na forma nanoparticulada é através da redução química de um precursor metálico (contendo íons Au^{+3}) pela adição de um agente redutor, sendo o citrato de sódio o principal composto utilizado para esta finalidade.⁸⁶ Entretanto, buscando otimizar as propriedades das AuNPs, outros agente com capacidade de redução podem ser utilizados, como o ácido ascórbico.⁸⁷

O ácido ascórbico é conhecidamente um importante antioxidante, que atua em processos fisiológicos e em mecanismos de defesa, podendo potencializar a produção de citocinas anti-inflamatórias e regular negativamente a produção de citocinas que acentuam a inflamação, auxiliando no equilíbrio da resposta imunológica.⁸⁸ Ademais, seu uso *in vitro* é indicado na composição de um meio indutor para diferenciação de células tronco pulpares em linhagem blástica e atividade de mineralização, juntamente com a dexametasona e uma fonte de íons fosfato como o B-glicerofosfato.¹⁹

Apesar do ouro ser considerado biocompatível, a sua forma nanoparticulada aumenta a interação com as células e tecidos, podendo acentuar sua toxicidade, mesmo que as AuNPs sejam menos tóxicas em comparação com outras nanopartículas metálicas.⁸⁹ O tipo de agente redutor e estabilizador utilizado na síntese de AuNPs desempenha um papel determinante no seu formato. O tamanho,

formato e natureza da superfície das nanopartículas são alguns dos fatores responsáveis pelas propriedades químicas, físicas e biológicas que as AuNPs podem apresentar.^{90,91} Portanto, qualquer alteração nesses parâmetros pode promover alterações em suas propriedades. Desta forma, alterações no processo de síntese das AuNPS torna necessário realizar novos testes de caracterização que busquem avaliar as propriedades físico-químicas e morfológicas das nanopartículas sintetizadas, bem como ensaios que investiguem sua citotoxicidade e se as propriedades biológicas se mantêm.

A espectroscopia de absorção no UV-Vis é um método comumente empregado para caracterizar as propriedades ópticas de nanopartículas de ouro⁹² devido à interação dos elétrons na superfície das nanopartículas metálicas (ressonância plasmônica de superfície) com o campo elétrico incidente.⁹³ Assim, as dispersões de nanopartículas de ouro possuem coloração avermelhada característica, e o comprimento de onda de máxima absorção da amostra pode ser relacionado ao diâmetro das nanopartículas de ouro por comparação com a literatura.⁹²

A aferição do potencial Zeta da dispersão de nanopartículas também pode auxiliar na sua caracterização. Quase todos os materiais particulados adquirem uma carga elétrica em sua superfície quando em contato com um líquido, devido a dissociação de grupos ionizáveis na superfície da partícula e pela adsorção de íons da solução na superfície da partícula. Assim, essa carga superficial altera a distribuição de íons na sua proximidade, aumentando a concentração de contra-íons junto à superfície, formando uma dupla camada elétrica. Aferir experimentalmente o potencial Zeta de uma dispersão fornece um indicador útil da carga superficial das partículas, o qual pode ser utilizado para prever e controlar a estabilidade da dispersão.^{94,95}

Quanto maior o potencial Zeta mais provável que a dispersão seja estável, pois as partículas carregadas repelem umas às outras, superando as forças de Van der Waals, as quais promovem agregação. São consideradas estáveis as dispersões coloidais que apresentam valores de potencial Zeta superiores a +30 mV ou inferiores a -30 mV.^{94,95}

Além dos testes de caracterização físico-química das AuNPS, e da avaliação *in vitro* de suas propriedades, testar seu efeito *in vivo* é fundamental para verificar seu potencial como agente anti-inflamatório. Ainda que inicialmente não seja viável o desenvolvimento de um material específico para o capeamento pulpar utilizando as

AuNPs, testá-las isoladamente sobre o tecido pulpar inflamado torna-se extremamente importante para avaliar sua efetividade anti-inflamatória *in vivo*. A inflamação pulpar experimental torna-se uma alternativa interessante para avaliação da efetividade anti-inflamatória de substâncias tendo em vista que promove uma inflamação tecidual em um ambiente isolado e controlado, no qual a modulação da intensidade dos eventos inflamatórios é um fator crítico para o adequado reparo do tecido pulpar lesionado.³⁵

3 PROPOSIÇÃO

3.1 OBJETIVOS GERAIS

Estudo 1: Avaliar a citotoxicidade e as propriedades físico-químicas e anti-inflamatórias de nanopartículas de ouro estabilizadas com ácido ascórbico em cultura de fibroblastos, macrófagos e células indiferenciadas de polpa dental humana.

Estudo 2: Validar o método de fluxometria por laser-Doppler (FLD) para diagnóstico da condição pulpar de primeiros molares superiores de ratos.

Estudo 3: Avaliar o efeito de nanopartículas de ouro estabilizadas com ácido ascórbico no tratamento de exposições pulpares em primeiros molares superiores de ratos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Estudo 1:

- a) Caracterizar as AuNPs sintetizadas quanto às suas características físico-químicas e morfológicas;
- b) Verificar o efeito das AuNPs sobre a viabilidade celular de fibroblastos 3T3, macrófagos J774 e cultura primária de células indiferenciadas de polpa dental humana (CIPDH); e
- c) Investigar o efeito das AuNPs na liberação de TNF- α em macrófagos estimulados por lipopolissacarídeo (LPS), buscando identificar um possível efeito anti-inflamatório *in vitro*.

Estudo 2:

- a) Determinar um método reprodutível para aferição do fluxo sanguíneo pulpar (FSP) de primeiros molares superiores de ratos através da fluxometria por laser-Doppler (FLD);
- b) Validar modelos de inflamação e necrose pulpar em primeiros molares superiores de ratos; e
- b) Avaliar a sensibilidade, especificidade e acurácia da FLD no diagnóstico de inflamação e necrose pulpar em primeiros molares superiores de ratos.

Estudo 3:

- a) Verificar o efeito da aplicação de AuNPs sobre exposições pulpares em molares de ratos na formação de barreira mineralizada, na integridade do tecido pulpar e na severidade da inflamação; e
- b) Verificar se a aplicação de AuNPs sobre exposições pulpares em molares de ratos promove alterações na microvascularização pulpar, avaliada através da FLD.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi realizado em três etapas, as quais serão descritas separadamente como capítulos isolados.

- Estudo 1: Atividade anti-inflamatória e biocompatibilidade de nanopartículas de ouro revestidas por ácido ascórbico em cultura primária de células indiferenciadas de polpa dental humana, fibroblastos 3T3 e macrófagos J774.
- Estudo 2: Validação do método de fluxometria por laser-Doppler para diagnóstico de inflamação e necrose pulpar em molares superiores de ratos Wistar.
- Estudo 3: Capeamento pulpar direto com nanopartículas de ouro revestidas por ácido ascórbico em molares superiores de ratos Wistar.

4.1 ESTUDO 1

4.1.1 Síntese das nanopartículas de ouro estabilizadas com ácido ascórbico (AuNPs)

As nanopartículas de ouro foram sintetizadas pelo método de redução química de íons AuCl_4^- , a partir do precursor metálico ácido tetracloroáurico, pela adição de um agente redutor sob aquecimento e agitação, conforme descrito por Turkevich et al. (1951)⁸⁶ com algumas modificações. O processo de síntese utilizou o ácido ascórbico como agente redutor e estabilizador.⁸⁷ A solução de ácido tetracloroáurico (1 mM - Sigma – Aldrich®, Missouri, EUA) foi aquecida a 90°C sob agitação constante. A solução de ácido ascórbico (0,48 mg / mL) foi adicionada e o sistema foi mantido sob agitação por 10 minutos até atingir a cor avermelhada característica da dispersão coloidal de ouro. O processo de síntese foi realizado pelo Grupo de Fenômenos Fototérmicos e Fluidos Complexos do Departamento de Física da Universidade Estadual de Ponta Grossa. No final do processo de síntese, a dispersão coloidal de AuNPs adquire a concentração final de 4 mg/mL.

Após a síntese de AuNPs de ácido ascórbico, amostras foram utilizadas para caracterização por Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM), Espectroscopia de Absorção no Ultravioleta Visível (UV-Vis) e potencial Zeta.

4.1.2 Microscopia Eletrônica de Transmissão

A dispersão de AuNPs foi aplicada sobre a grade revestida de carbono, seca à temperatura ambiente e observada sob TEM para analisar a morfologia e o tamanho das AuNPs. As micrografias da amostra foram obtidas por microscópio eletrônico de transmissão JEOL modelo JEM-1400 Electron Microscope. A distribuição de tamanho das partículas foi analisada através dos limites mínimos e máximos de diâmetro de partículas, através da análise das micrografias no *Software ImageJ*.

4.1.3 Espectroscopia de absorção do Ultravioleta-Visível (UV-Vis)

A banda de ressonância plasmônica de superfície (SPR) das AuNPs foi caracterizada por espectrofotometria no UV-Visível em espectrofotômetro modelo UV-1800, LAB-X, modelo XDR – 6000 (Shimadzu). Para isso, uma luz de laser entre 400 a 800 nm foi incidida sobre uma alíquota da amostra presente em uma cubeta de quartzo, verificando o comprimento de onda de máxima absorção.

4.1.4 Potencial Zeta

A dispersão coloidal de AuNPs foi mantida em temperatura ambiente e levadas ao banho ultrassônico por 10 minutos. Alíquotas de 2 mL foram transferidas para microtubos e então encaminhadas para análise do Potencial Zeta (Zetasizer Nanoseries ZS90 - Malvern Instruments®, Malvern, Reino Unido) no Complexo de Laboratórios Multiusuários da Universidade Estadual de Ponta Grossa.

4.1.5 Cultura de células – 3T3, J774 e Cultura primária de células indiferenciadas de polpa dental humana (CIPDH)

As linhagens de células foram obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro. As linhagens de fibroblastos (3T3) e macrófagos (J774) murinos foram cultivadas com meio DMEM (*Dulbeccos's Modified Eagle's Medium*) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) e 1% de penicilina/estreptomicina (Induslab). O meio de cultura foi trocado 3 vezes na semana, e ambas as linhagens apresentavam tempo de

dobramento de 2 a 3 dias. As células foram cultivadas em frascos de cultura celular de 75 cm² e mantidas a 36°C em atmosfera úmida com 5% de CO₂.

Quando a cultura atingia 70% de confluência as garrafas eram lavadas com solução de PBS estéril e as células desaderidas e transferidas para novos frascos de subcultivos. As células 3T3 foram desaderidas por ação enzimática com solução de tripsina/EDTA (3 mL por 5 minutos) e as células J774 desaderidas por ação mecânica com o auxílio de um *scraper*.

A cultura primária de células indiferenciadas de polpa dental humana foi obtida a partir do tecido pulpar de terceiros molares recém-extraídos (por indicação clínica) pelo desprendimento de células de fragmentos de tecido, segundo a técnica de crescimento de explantes (figura 4.1).

Imediatamente após a extração, o dente foi desinfetado por 30 segundos através da fricção com gaze embedida em solução de clorexidina a 2,5% e acondicionado em frasco estéril contendo DMEM com 10% de SFB e 1% de penicilina/estreptomicina até ser transportado ao laboratório. Em ambiente estéril, o dente foi fraturado com o auxílio de um martelo sobre uma superfície rígida e o tecido pulpar removido, lavado para a remoção de restos de dentina, fragmentado e inserido em frascos de cultura de células de 75 cm² contendo DMEM suplementado com 20% de SFB e 1% de penicilina/estreptomicina. Os frascos de cultura foram mantidos a 36°C em ambiente úmido a 5% de CO₂. Após o início da proliferação das células na garrafa, os tecidos foram removidos e, ao atingir 70% de confluência, as células foram desaderidas com auxílio de solução de tripsina/EDTA e realizadas subculturas. Todos os experimentos foram realizados em triplicata com células entre a 2^a e a 4^a passagem. Para os experimentos foram utilizadas células provenientes de 3 dentes.

Figura 4.1. Processo de cultura primária de células indiferenciadas de polpa dental humana (CIPDH).

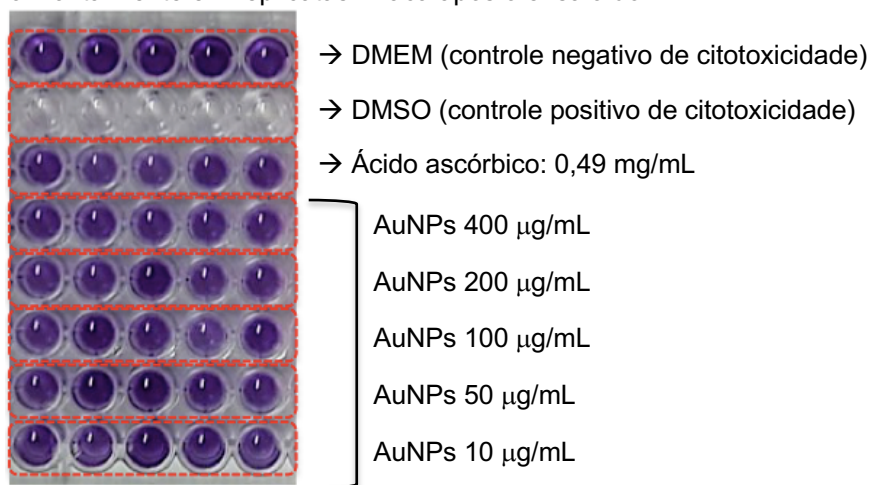


Fonte: o autor.

4.1.6 Tratamentos

Células 3T3, J774 e CIPDH foram tratadas usando dispersões de AuNPs por 24 e 48h para os ensaios de MTT e análise da morfologia celular. As células J774 foram tratadas usando dispersões de AuNPs e LPS (1 $\mu\text{g/mL}$) por 24 horas para o ensaio de liberação de $\text{TNF-}\alpha$ estimulada por LPS. As AuNPs foram aplicadas em diferentes concentrações: 400, 200, 100, 50 e 10 $\mu\text{g/mL}$, usando como dispersante o meio de cultura (DMEM) sem SFB. As diluições foram preparadas imediatamente antes de cada experimento e sonicadas em banho ultrassônico para evitar a aglomeração de partículas. O grupo controle foi tratado com DMEM livre de AuNPs e o grupo controle de citotoxicidade foi tratado com DMEM com 10% de dimetilsulfóxido (DMSO). Um grupo foi tratado com Ácido Ascórbico a 0,49 mg/mL , concentração utilizada na síntese das AuNPs (figura 4.2). O meio não foi trocado durante o processo de incubação.

Figura 4.2 - Representação da distribuição dos diferentes tratamentos em placa de 96 poços, dispostos horizontalmente em replicatas. Placa após o ensaio do MTT.



Fonte: o autor.

4.1.7 Brometo de tiazolil azul de tetrazólio (MTT) para análise da viabilidade celular

Para testar de maneira *in vitro* a citotoxicidade das AuNPs, foi realizado o ensaio do MTT para análise de viabilidade celular. O MTT é um método colorimétrico baseado na redução do sal amarelo de tetrazólio pelas enzimas mitocondriais de células metabolicamente ativas, formando cristais azul de formazan, que são solubilizados e analisados por espectrofotometria.⁹⁶ As células foram plaqueadas em placas de 96 poços na proporção de 1×10^4 células/poço em DMEM com 10% de SFB. Após 24 horas, as células foram tratadas como descrito na seção 4.1.6 Tratamentos. Após os períodos experimentais de 24 e 48h, a solução de MTT foi adicionada aos poços a 0,5 mg/mL e as microplacas mantidas a 36°C em 5% de CO₂ por 2h. Posteriormente, os cristais foram solubilizados com o uso de DMSO e leitura por espectrofotômetro no comprimento de onda de 570 nm. Os poços que não receberam tratamento com AuNPs foram utilizados como controle, sendo considerado 100% de viabilidade celular. Foram realizados três experimentos independentes em triplicata.

4.1.8 Análise morfológica de células indiferenciadas de polpa dental humana pela coloração de May-Grunwald Giemsa

Inicialmente 5000 células de polpa dental humana foram plaqueadas em placas de 24 poços contendo uma lamínula de vidro circular no fundo e incubadas com DMEM a 36°C em 5% de CO₂ por 24 h. Após este período, o meio foi removido e 0,5

mL das dispersões de AuNPs foram adicionados conforme descrito na seção 4.1.6 Tratamentos e incubadas por 24 e 48h. Na sequência os poços foram lavados com PBS, as células foram fixadas com formaldeído a 2% por 2 minutos e coradas com a coloração de May-Grunwald Giemsa.⁹⁷ O grupo que não recebeu tratamento foi utilizado como controle da morfologia celular normal. Dois ensaios independentes foram realizados em duplicata.

4.1.9 Produção de TNF- α em macrófagos estimulados por LPS

Os macrófagos J774 foram plaqueados em placa de 24 poços (2×10^5 células/poço) com DMEM com 10% de SFB e incubados a 36°C em 5% de CO₂ por 24 h. Na sequência, o meio foi removido e 0,5 mL das dispersões de nanopartículas foram adicionados em cada poço juntamente com LPS, conforme descrito na seção 4.1.6. Tratamentos. Após 24h de incubação, a quantidade de TNF- α liberada no sobrenadante foi quantificada por Ensaio Imunoenzimático (ELISA) (kit de ELISA para TNF alfa - Ready-SET-Go! ® 10 x 96 - Termo Fisher Scientific). Foram realizados 2 ensaios independentes em triplicata.

4.1.10. Análise estatística

As análises estatísticas dos ensaios de citotoxicidade e de liberação de TNF- α foram realizadas usando a análise de variância unidirecional (ANOVA) e pós teste de Tukey para comparações médias, após verificação da normalidade dos dados pelo teste de Shapiro-Wilk, no programa GraphPad Prism 7.

4.2 ESTUDO 2

4.2.1 Delineamento experimental

Foram utilizados 27 ratos Wistar fêmeas (*Rattus norvegicus*, albinus Wistar) entre 2 e 3 meses, pesando 200-250 g. Os animais foram mantidos em biotério, com ambiente climatizado a 22°C, com dieta equilibrada acesso livre à água. Os experimentos foram realizados de acordo com os princípios éticos do COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal) e aprovados pela Comissão de Ética em Uso

Animal local sob o protocolo nº 045/2017. O uso preferencial de fêmeas ocorreu devido à necessidade de usar as guias durante todo o período experimental, com as fêmeas apresentando um crescimento menos pronunciado,⁹⁸ permitindo um melhor encaixe das guias por um período mais longo durante a etapa de padronização do método da fluxometria pulpar por laser-Doppler.

Inicialmente, 10 animais foram utilizados para padronizar o método de aferição do fluxo sanguíneo da microvascularização pulpar (FSP) dos primeiros molares superiores dos ratos através da fluxometria por laser-Doppler (FLD). Para isso, foram confeccionadas diferentes guias para auxiliar no posicionamento da sonda do aparelho da superfície dentária dos animais conforme descrito no item 4.2.2. Os dados do FSP obtidos com e sem o auxílio das guias foram analisados e determinado o método que proporcionou os resultados mais estáveis e reprodutíveis, permitindo a padronização do método de aferição.

Na sequência, 17 animais foram divididos em 3 grupos (n=5 por grupo) para receber diferentes tratamentos para estabelecer modelo de polpa inflamada, polpa necrótica e grupo naive.

- Grupo naive: sem exposição pulpar e sem tratamento. Foram acompanhados por 21 dias.
- Grupo inflamação pulpar: exposição pulpar, sem tratamento e fechamento da cavidade. O procedimento de exposição pulpar foi realizado nos primeiros molares superiores, mas nenhum material de proteção pulpar foi aplicado. Um pequeno fragmento de algodão estéril foi inserido sobre a região da exposição e a cavidade foi fechada com ionômero de vidro fotopolimerizável. Os animais foram acompanhados por 48 horas.
- Grupo necrose pulpar: exposição pulpar sem tratamento e cavidade aberta. O procedimento de exposição pulpar foi realizado nos primeiros molares superiores. O tecido não recebeu material de proteção pulpar e a cavidade foi deixada aberta durante todo o período experimental. Os animais foram acompanhados por 21 dias.

Dois animais foram utilizados para uma breve análise histopatológica descritiva após 24h no grupo inflamação pulpar e após 14 dias no grupo necrose pulpar, os quais não foram considerados nas análises estatísticas.

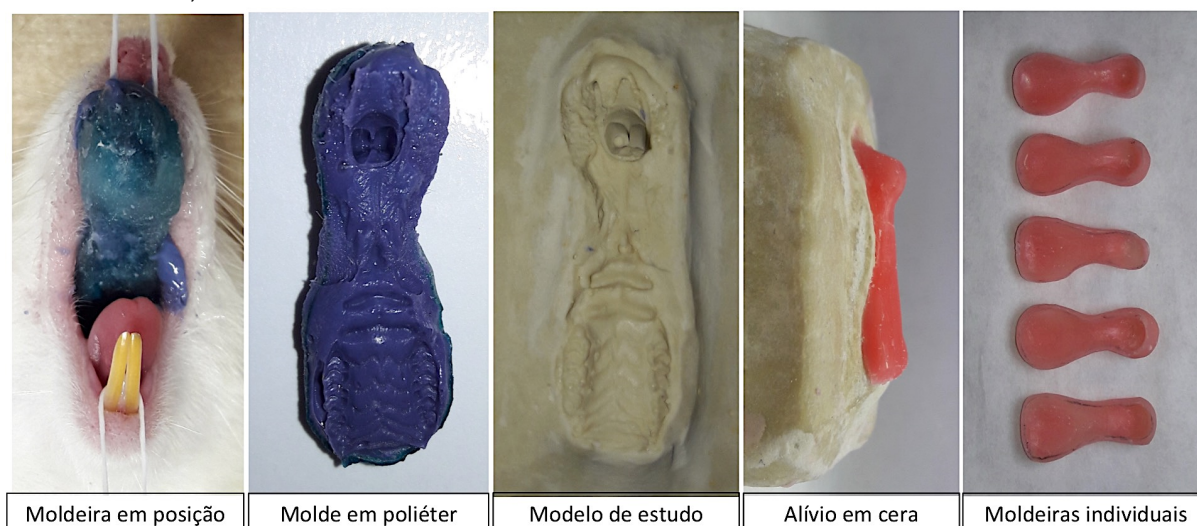
Após os procedimentos, os animais foram submetidos à medição do FSP por FLD, seguindo o protocolo definido na etapa de padronização.

4.2.2 Confeção e validação das guias

A fim de nortear o posicionamento da sonda do laser-Doppler (Moor Instruments - MoorVMS-LDF1) perpendicularmente sobre a superfície oclusal dos primeiros molares superiores direito e esquerdo das ratas, foram confeccionadas guias em silicone de condensação (flexíveis) e em resina acrílica (rígidas) individualmente para cada animal, totalizando 4 guias por animal (flexíveis D e E / rígidas D e E). As guias individuais (flexíveis D e E e rígidas D e E) que obtivessem os resultados mais reprodutíveis foram posteriormente utilizadas como guias universais para novas aferições do FSP em todos os animais.

Inicialmente, uma moldeira em resina acrílica foi confeccionada sobre a moldagem de uma maxila de crânio seco de um rato de descarte. Na sequência, um dos animais foi anestesiado com hidrato de cloralal 4% na dose de 400mg/kg e moldado com poliéter para se obter um modelo de gesso da maxila do animal. Sobre este modelo, foi realizado um alívio em cera nº 7 (com a finalidade de criar espaço para a inserção do material de moldagem) e foram confeccionadas moldeiras para todos os animais (n=10) (figura 4.3).

Figura 4.3 - Processo de obtenção de moldeiras individuais para confecção das guias. Uma moldeira inicial confeccionada sobre a maxila de um crânio seco de *Rattus norvegicus* foi utilizada para a moldagem inicial de um animal com poliéter e confecção de um modelo de estudo em gesso pedra. Sobre o modelo, foi realizado um alívio em cera e confeccionadas 10 moldeiras individuais.

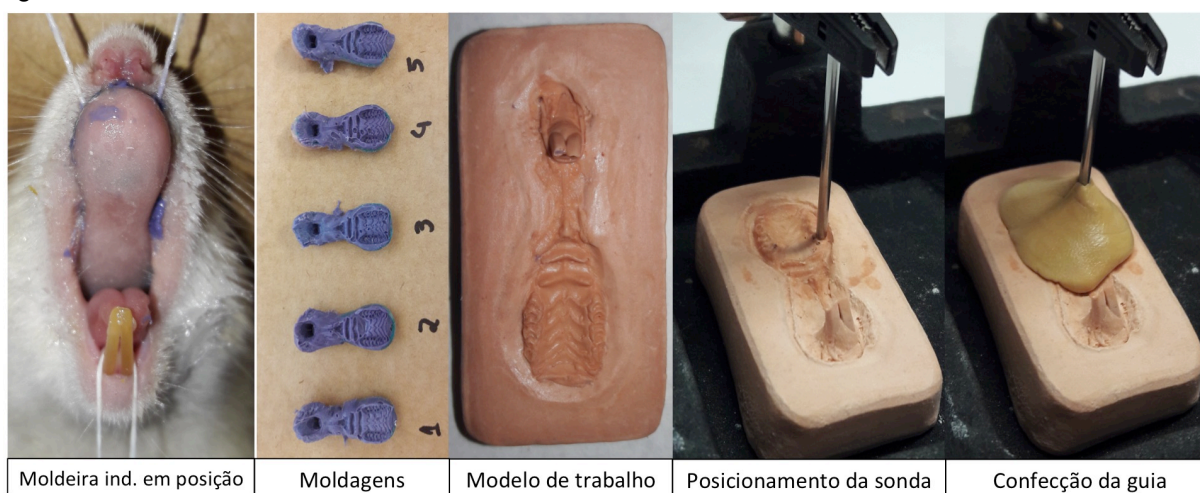


Fonte: o autor.

Na sessão seguinte, 10 animais foram anestesiados e moldados com poliéter para obter modelos individuais da maxila feitos com gesso tipo IV. Sobre estes modelos, foram confeccionadas as guias flexíveis (em silicone de adição) e guias

rígidas (em resina acrílica autopolimerizável) norteando o posicionamento da sonda do laser-Doppler (Moor Instruments - MoorVMS-LDF1) sobre a superfície oclusal dos primeiros molares superiores direito e esquerdo. Para isso, com o auxílio de um pedestal, a sonda foi posicionada perpendicularmente à face oclusal dos primeiros molares superiores e mantidas em posição enquanto o material (silicone ou resina acrílica) era depositado ao redor da sonda para registrar sua posição (Figura 4.4).

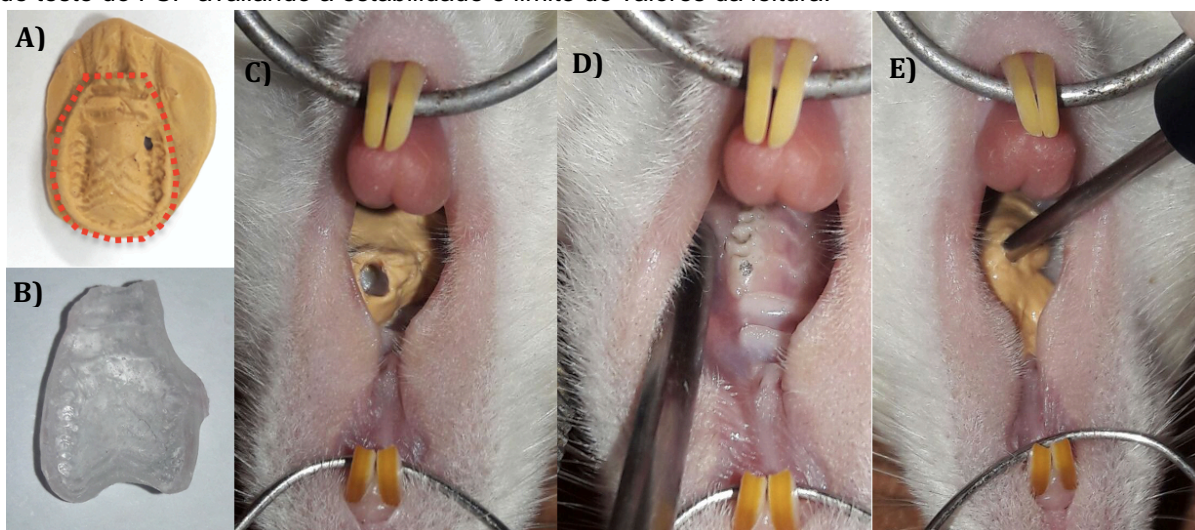
Figura 4.4 - Processo de moldagem individual e confecção as guias. Cada animal foi moldado com uma moldeira individual e poliéster e confeccionados modelos de trabalho em gesso tipo IV. A sonda do equipamento do laser-Doppler foi posicionada na superfície oclusal dos primeiros molares superiores e realizada a deposição de silicone de adição ou resina acrílica para confecção das guias flexíveis e rígidas.



Fonte: o autor.

As guias de silicone foram cortadas e as guias de resina acrílica foram desgastadas, estendendo-se para a região de fundo de sulco vestibular na região dos molares, limitadas posteriormente ao final do palato duro e anteriormente ao final do primeiro sulco palatino (Figura 5). Com as guias individuais prontas, os animais foram novamente sedados e as guias de cada posição foram testadas. Para a validação as guias foram colocadas em posição, verificada a sua estabilidade, e um grafite foi inserido na luz das guias para verificar se a marcação permanecia restrita à superfície oclusal do primeiro molar superior. Além disso, foi realizada uma leitura da FSP experimental a fim de verificar se os valores obtidos eram estáveis e condizentes com a fuxometria da estrutura dentária com polpa saudável, conforme observado em um estudo piloto (com valores de FSP entre 15 e 30 UA) (figura 4.5). Caso a guia fornecesse valores discrepantes ou guiasse a sonda para a mucosa, uma nova guia era confeccionada e testada em uma nova sessão de validação.

Figura 4.5 - Imagem final das guias (a e b) e etapas de validação das guias flexíveis: c) avaliação de estabilidade da guia e marcação com grafite na luz da guia; d) Verificação da área de marcação do grafite que deve estar restrita à área oclusal do primeiro molar superior; e e) inserção da sonda e leitura de teste do FSP avaliando a estabilidade e limite de valores da leitura.



Fonte: o autor.

4.2.3 Fluxometria por laser-Doppler de primeiros molares superiores de ratos para padronização do método

Para realização das aferições do FSP foi utilizado um aparelho monitor de FLD de diodo do tipo semicondutor MoorVMS-LDF1, o qual utiliza comprimento de onda de $785\text{nm} \pm 10\text{nm}$, com emissão de luz em feixe divergente da sonda óptica, com abertura de 0,5 a 1,2 mW, com dispersão angular de 26 graus com abertura numérica de 0,22 da fibra de vidro de sílica de 200-microns. Inicialmente, os animais foram sedados com hidrato de cloral a 4% a uma dose de 400 mg/kg por via intraperitoneal. Antes de cada sessão de aferição a sonda do equipamento do laser-Doppler era calibrada conforme indicado no manual do equipamento, sempre utilizando a mesma sonda em todas as leituras a fim de controlar um possível viés. Para a validação do método, todos os animais foram submetidos a duas sessões de aferição do FSP dos primeiros molares superiores, com intervalo de 1 semana entre cada uma. As medições foram realizadas por 2 operadores diferentes, a fim de analisar a reprodutibilidade dos dados intra e interexaminadores. Cada operador fez 3 registros de pelo menos 1 minuto em cada sessão para cada dente com os diferentes métodos: leituras sem guia (posicionadas livremente pelo operador) e leituras auxiliadas pelas guias individuais flexíveis e rígidas e pelas guias universais flexíveis e rígidas. O valor médio de FSP de cada registro considerou a fluxometria dos dez segundos mais estáveis no início, no meio e no final do registro. Para cada sessão, foi verificada a

mediana dos três registros de FSP de cada operador. O valor FSP de cada animal em cada sessão foi obtido pela média dos valores obtidos dos primeiros molares superiores direito e esquerdo. Posteriormente, os dados foram analisados conforme descrito no item 4.2.8. para determinação da técnica de aferição do FSP dos primeiros molares superiores mais reprodutível.

4.2.4 Modelos de inflamação e necrose pulpar

Após a pesagem, os animais foram sedados por administração intraperitoneal de solução de hidrato de cloral a 4% na dose de 400 mg/kg. Em seguida, os animais foram posicionados em uma mesa cirúrgica que permite a abertura bucal e o acesso aos dentes superiores. O campo operatório foi desinfetado com solução de clorexidina a 2%. Todo o procedimento de acesso e capeamento pulpar foi realizado com isolamento relativo. Com o auxílio de broca esférica diamantada 1012 e irrigação com solução salina, uma cavidade foi preparada na superfície oclusal dos primeiros molares superiores com cerca de 1mm de profundidade e diâmetro, atingindo o mais próximo possível da polpa dentária, deixando apenas uma fina camada de dentina. A camada de dentina foi perfurada com uma agulha hipodérmica descartável, o tecido pulpar foi exposto e realizada a compressão com algodão estéril e solução salina. Nos animais do grupo inflamação, um pedaço de algodão estéril foi colocado sobre a região da exposição pulpar e a cavidade restaurada com ionômero de vidro fotopolimerizável (Ionofast® - Biodinâmica). O dente antagonista foi levemente desgastado para evitar a sobrecarga oclusal no dente operado e a queda da restauração (figura 4.6). Buscando avaliar apenas a inflamação do tecido pulpar, os animais foram acompanhados pelo período de 48h, considerando que a exposição mecânica da polpa produz alterações inflamatórias em apenas um dia e mudanças perirradiculares já em cinco dias.⁹⁹ Os animais do grupo necrose passaram pela mesma etapa de exposição pulpar, entretanto a cavidade foi deixada aberta.

Nenhuma medicação para controle de dor foi administrada a fim de evitar interferências no quadro inflamatório e parâmetros vasculares, sendo adotadas outras medidas para minimização da dor e avaliação contínua dos animais. No modelo de indução de necrose pulpar, manter o dente aberto minimiza a expectativa de dor do animal.¹⁰⁰ No grupo inflamação, o tecido pulpar foi apenas exposto, sem a aplicação de substâncias flogísticas, além de terem sido acompanhados por um curto período

de tempo (48h). Contudo, durante todo o período experimental atentou-se para identificar sinais de ansiedade e estresse dos animais por motivo de dor que pudessem indicar a necessidade de interrupção do estudo, como movimentos anormais da cabeça e agitação contínua da cabeça no chão ou na parede da gaiola e fricção excessiva da boca com movimentos da pata dianteiras com o de limpeza da cabeça (grooming).¹⁰¹

Figura 4.6 - Procedimento de exposição pulpar para indução de inflamação. A cavidade foi realizada com broca esférica diamantada 1012 em alta rotação sob irrigação e perfuração da parede dentinária com agulha hipodérmica. O sangramento foi controlado com a compressão de fragmentos de algodão estéril imerso em soro fisiológico. A cavidade foi seca e inserido um fragmento de algodão estéril sobre a região da exposição. Na sequência, a cavidade foi preenchida com ionômero de vidro fotopolimezável.



Fonte: o autor

4.2.5 Fluxometria por laser-Doppler em molares com inflamação e necrose pulpar

Nesse momento, as medições foram realizadas por um único operador de acordo com os resultados dos testes de validação que indicaram o uso ou não das guias para posicionamento da sonda na superfície dental. Antes de cada aferição, os animais foram sedados com o mesmo protocolo anestésico. A medição da FLD foi realizada imediatamente antes da exposição pulpar para obter o valor basal de FSP dos dentes dos animais e imediatamente após a exposição pulpar. Em seguida, o FSP foi aferido periodicamente: após 6h, 24h e 48h para o grupo inflamação pulpar, após 7 dias, 14 dias e 21 dias para o grupo necrose pulpar, e após 6h, 24h, 48h, 7 dias, 14 dias e 21 dias para o grupo naive.

Foram realizadas três leituras de um minuto em cada dente. Para cada registro, a mediana do FSP foi calculada considerando os dez segundos mais estáveis no início, meio e final do registro. Para cada sessão, a mediana de três registros do FSP foi registrada para cada dente.

4.2.6 Eutanásia dos animais e coleta das amostras

Após o período experimental de 48h (para o grupo inflamação) e 21 dias (para os grupos naïve e necrose), os animais foram sedados com o mesmo protocolo anestésico e realizado deslocamento cervical. A maxila de cada animal foi removida e dividida em duas hemimaxilas, o que resultou em uma amostra de 10 hemimaxilas por grupo.

4.2.7 Análise histológica

As hemimaxilas foram encaminhadas para histologia, fixadas em solução de formol a 10% por 48 horas e descalcificadas com solução de EDTA a 9% por 4 semanas em plataforma orbital. As amostras foram processadas e preparadas para inclusão em parafina com a face vestibular paralela ao plano de corte. Cortes seriados de 6 µm de espessura foram corados com Hematoxilina e Eosina (HE), e três cortes foram analisados para cada amostra. A análise histológica descritiva foi utilizada para verificar os aspectos morfológicos da resposta pulpar, considerando a intensidade da inflamação, o tipo de infiltrado inflamatório (polimorfonuclear ou mononuclear), organização da camada de odontoblastos e formação da matriz mineralizada, morfologia dos vasos sanguíneos e presença de tecido necrótico.¹⁰²⁻¹⁰⁴ Os cortes foram analisados por um único operador treinado cego, sendo determinado um diagnóstico histopatológico final: tecido pulpar vital saudável, tecido pulpar inflamado e tecido pulpar necrosado (priorizando a característica mais evidente)

4.2.8 Análise estatística para padronização do método

Inicialmente, foi verificado o coeficiente de variação dos dados de FSP obtidos pelos diferentes métodos (sem guia, com guias individuais flexíveis e rígidas e guias universais flexíveis e rígidas) obtidos na etapa de padronização. O método com menor coeficiente de variação intra e interexaminadores foi adotado como o mais reprodutível. Posteriormente, o teste de concordância de Bland-Altman foi realizado para avaliar a reprodutibilidade dos dados intra e interexaminadores obtidos com o método escolhido, sempre aplicado em conjunto com o teste t para uma amostra (avaliando a diferença das medidas do valor hipotético 0). Valores de $p < 0,05$ foram

considerados como indicativos de significância estatística. Os testes foram realizados no software estatístico GraphPad Prism 7.

4.2.9 Análise estatística do poder discriminativo da fluxometria por laser-Doppler para diagnóstico pulpar

O método que indicou o menor coeficiente de variação dos dados e mostrou boa concordância pelo teste de Bland-Altman foi utilizado para a análise do FSP nos modelos de inflamação e necrose pulpar. As variações do FSP na inflamação e necrose ao longo do período experimental foram avaliadas pela análise de variância de ANOVA de medidas repetidas seguida do pós teste de Tukey a um nível de significância de 0,05 (GraphPad Prism 7).

A avaliação do poder discriminativo da FLD para o diagnóstico da condição pulpar em molares superiores de foi realizada relacionado o diagnóstico histopatológico (considerado como padrão ouro) com os valores de fluxometria em uma curva ROC (Receiver Operating Characteristic) utilizando o software estatístico IBM SPSS Statistics 21. A partir das curvas ROC (uma para o diagnóstico de inflamação x saudável e outra para o diagnóstico de necrose x saudável) a área sob a curva gerada foi comparada com a diagonal de hipótese nula com um nível de significância de 0,05. Em caso de significância estatística, foram estabelecidos os pontos de corte dos valores de FSP para o diagnóstico de inflamação e/ou necrose, que proporcionaram a melhor combinação de valores de sensibilidade e especificidade. A partir deste ponto de corte foram apresentados os números de verdadeiros positivos e negativos e falsos positivos e negativos em uma tabela de contingência (tabela 4.1) permitindo verificar o poder discriminativo do teste evidenciado pela sua sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo e acurácia no diagnóstico de inflamação ou necrose.

Tabela 4.1 - Exemplo de tabela de contingência para análise da frequência da distribuição dos dados e análise da inter-relação entre o método teste (fluxometria por laser-Doppler) e o método padrão (diagnóstico histopatológico) para validação do método.

Fluxometria por laser-Doppler	Histopatológico (padrão ouro)		
	POSITIVO (inflamação / necrose)	NEGATIVO (saúdável)	TOTAL
POSITIVO ` (inflamação / necrose)	A	B	A + B
NEGATIVO (saúdável)	C	D	C + D
TOTAL	A + C	B + D	N (A + B + C + D)
Cálculos para Validação do Teste			
Sensibilidade	A / (A+C)		
Especificidade	D / (B+D)		
Valor preditivo +	A / (A+B)		
Valor preditivo -	D / (C+D)		
Acurácia	(A+D) / N		

Nota: Tabelas individuais são aplicadas para comparação de inflamação x saúdável e necrose x saúdável.

4.3 ESTUDO 3

4.3.1 Delineamento experimental

Foram utilizadas 16 ratas Wistar (*Rattus norvegicus*, Albinus Wistar) entre 2 e 3 meses, pesando 200-250 g. Os animais foram mantidos em biotério, com ambiente climatizado a 22°C, com dieta equilibrada acesso livre à água. Os experimentos foram realizados de acordo com os princípios éticos do COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal) e aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal local sob o protocolo no 045/2017. O uso preferencial de fêmeas ocorreu devido ao método de FLD ter sido padronizado em animais fêmeas em estudos anteriores.

Os animais foram divididos em 3 grupos (n = 4 por grupo).

- Sham - Exposição pulpar e capeamento com algodão estéril. Restauração com resina composta. Leituras do FSP ao longo do período experimental de 21 dias;
- Hidróxido de cálcio (CaOH) – Exposição pulpar e capeamento com hidróxido de cálcio (padrão ouro). Restauração com resina composta. Leituras do FSP durante todo o período experimental de 21 dias; e
- AuNPs – Exposição pulpar e capeamento com algodão estéril com AuNPs (grupo experimental). Restauração com resina composta. Leituras do FSP durante todo o período experimental de 21 dias;

Quatro animais foram utilizados para uma breve análise histopatológica descritiva após 7 e 14 dias de tratamento nos grupos AuNPs e CaOH, os quais não foram considerados nas análises estatísticas.

4.3.2 Exposição pulpar e aplicação dos tratamentos

Antes dos procedimentos, os animais foram anestesiados com solução de hidrato de cloral a 4% na dose de 400 mg/ kg por injeção intraperitoneal. Os animais foram posicionados em mesa cirúrgica que permitisse a abertura bucal e acesso aos dentes do animal. Com o auxílio de uma broca esférica diamantada número 1012, foi realizada uma cavidade na oclusal dos primeiros molares superiores direito e esquerdo com 1 mm de profundidade aproximando-se ao máximo do tecido pulpar. Com uma agulha hipodérmica descartável, a parede de dentina foi perfurada e o tecido pulpar exposto. A hemostasia foi realizada com algodão estéril e solução fisiológica. Na sequência, os animais receberam os tratamentos determinados para seus respectivos grupos. O grupo Sham não recebeu material de proteção pulpar, sendo inserido apenas um fragmento de algodão estéril sobre o tecido pulpar e a cavidade fechada com adesivo dentinário autoadesivo (Ambar APS) (fotoativado por 20 segundos) e resina composta (fotopolimerizada por 40 segundos). O grupo CaOH recebeu uma pasta de hidróxido de cálcio P.A. com salina estéril sobre a exposição pulpar, seguido de um fragmento de algodão estéril, adesivo dentinário e resina composta. O grupo experimental recebeu um fragmento de algodão estéril imerso em 10 μ L da dispersão de AuNPs (na concentração de síntese a 4 mg/mL), adesivo dentinário e resina composta. Ao final, o dente antagonista foi levemente desgastado a fim de evitar a sobrecarga oclusal do dente operado, evitando a queda da restauração, permitindo o reparo tecidual.

4.3.3 Fluxometria por Laser Doppler da microvascularização pulpar

Para aferição do FSP utilizamos um aparelho monitor de FLD de diodo do tipo semiconductor MoorVMS-LDF1, o qual utiliza comprimento de onda de $785\text{nm} \pm 10\text{nm}$, com emissão de luz em feixe divergente da sonda óptica, com abertura de 0,5 a 1,2 mW, com dispersão angular de 26 graus com abertura numérica de 0,22 da fibra de vidro de sílica de 200-microns.

O FSP dos primeiros molares superiores foi aferido periodicamente nos animais, sendo posicionada a sonda do laser Doppler perpendicular ao dente diretamente sobre a face oclusal dos primeiros molares superiores e realizada uma leitura basal, antes da exposição pulpar, e uma leitura imediatamente após a exposição pulpar. Na sequência, novas leituras foram realizadas após 3, 5, 7, 14 e 21 dias. Apenas um operador realizou todas as aferições utilizando uma única sonda, a qual foi calibrada segundo as orientações do equipamento. Para cada momento de aferição, foram realizados 3 registros de 1 minuto, sendo analisada a média de cada registro avaliando-se trechos de 10 segundos que se mantiveram estáveis no início, no meio e no final da leitura. Ao final, a média do valor de FSP de cada sessão foi calculado.

4.3.4 Eutanásia dos animais e coleta das amostras

Após o período experimental de 21 dias, os animais foram sedados seguindo o mesmo protocolo anestésico e eutanaziados por deslocamento cervical. As maxilas dos animais foram removidas e divididas em 2 hemimaxilas (contendo os primeiros molares superiores direito e esquerdo tratados), totalizando 8 dentes para cada grupo.

4.3.5 Análise histológica

A análise histológica considerou a intensidade da inflamação, o tipo de infiltrado inflamatório, a organização da camada de odontoblastos, a formação da ponte dentinária e a presença de tecido necrótico.¹⁰²⁻¹⁰⁴ Cada corte foi analisado de acordo com Popovic-Bajic et al. (2013)¹⁰⁵, recebendo escores para cada parâmetro seguindo os critérios abaixo:

a) Formação de ponte dentinária:

- 0- ausência de formação de ponte dentinária;
- 1- presença de ponte dentinária incompleta na área de exposição pulpar;
- 2- presença de ponte dentinária na superfície lateral da exposição pulpar; e
- 3- presença de ponte dentinária completa, cobrindo toda a área de exposição pulpar.

b) Integridade morfológica dos odontoblastos e tecido pulpar:

- 0 - tecido pulpar normal;
- 1- desorganização da camada odontoblástica, proliferação e hiperatividade;

2- desorganização completa do tecido pulpar; e

3- Necrose pulpar.

c) Gravidade da resposta inflamatória:

0- nenhum. Ausência ou muito poucas células inflamatórias;

1- inflamação leve - células inflamatórias abaixo da região do material de capeamento;

2- inflamação moderada - mais de um terço do tecido pulpar com infiltrado de células inflamatórias; e

3- inflamação grave - polpa difusamente infiltrada com células mononucleares, com destruição da organização histológica normal do tecido pulpar.

4.3.6 Análise estatística

As variáveis quantitativas (fluxo sanguíneo pulpar) foram analisadas por Análise de Variância de uma via (ANOVA), e o pós-teste de Tukey foi aplicado quando foi encontrada diferença significativa entre os grupos, sempre após a verificação da normalidade dos dados com o teste de Shapiro-Wilk. Os escores obtidos pela análise histológica foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de comparações múltiplas de Dunn. As análises foram realizadas no software estatístico GraphPad Prism 7 empregando um nível de significância de 0,05.

5 ARTIGOS

5.1 ARTIGO 1: ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITY AND BIOCOMPATIBILITY OF ASCORBIC ACID-COATED GOLD NANOPARTICLES IN PRIMARY CULTURE OF UNDIFFERENTIATED CELLS OF HUMAN DENTAL PULP

SANSON, M.A.S.^{1,4}; HULLER, D.¹; ALEGRIA, L.F.A.¹; LENART, V.M.²; OTUKI, M.F.³; SANTOS, F.A.⁴

¹ PhD student - Odontology at State University of Ponta Grossa

² PhD in Physics - State University of Ponta Grossa

³ Professor of Department of Pharmacology - Federal University of Paraná

⁴ Professor of Department of Odontology - State University of Ponta Grossa

Abstract

Introduction: Direct pulp capping consists of the therapeutic application of material on the exposed dental pulp in order to seal the region and allow the pulp repair process, maintaining the vitality of the pulp tissue. Gold nanoparticles (AuNPs), which present anti-inflammatory, antioxidant and antimicrobial effects, can be a therapeutic option for this purpose. **Objective:** To perform the physical-chemical characterization of ascorbic acid coated AuNPs, to investigate their cytotoxicity on fibroblasts (3T3), macrophages (J774) and undifferentiated cells of human dental pulp (UCHDP) and their anti-inflammatory effect in vitro. **Material and methods:** Nanoparticles were characterized by visible ultraviolet spectroscopy, transmission electron microscopy with particle size analysis and zeta potential. The three cell lines were incubated with AuNPs at concentrations of 400, 200, 100, 50 and 10 µg/ml per 24 and 48 hours, and cell viability was evaluated by the MTT assay and morphological analysis with staining May-Grunwald Giemsa. The J774 macrophages were stimulated by 1 mg/ml LPS, incubated with AuNPs and quantified the TNF-α release (ELISA). **Results:** AuNPs were spherical, with a diameter of 35±11 nm and the maximum absorption band at 535 nm. AuNPs did not decrease cell viability of 3T3 and J774. The nanoparticles decreased the viability of UCHDP after 48h of exposure to 75% (400 µg/ml), 82% (200 µg/ml) and 84% (100 µg/ml), with some cells being verified in the apoptosis process, but not considered cytotoxic. AuNPs were able to decrease the production of TNF-α by macrophages in 35% to 47% when incubated with low doses of AuNPs. **Conclusions:** AuNPs present anti-inflammatory activity in vitro and can be considered biocompatible with 3T3 fibroblasts, J774 macrophages, and UCHDP.

Keywords: dental pulp; cell culture techniques; metal nanoparticles; gold colloid.

Introduction

Direct pulp capping is a well-established technique in dentistry that consists in placing a medicament directly over the exposed pulp (direct pulp cap) or a lining material is placed over the bottom of the cavity or over residual caries (indirect pulp cap), that aims to preserve the vitality of dental pulp, especially in cases of accidental exposure of the pulp during restorative procedures, traumatic dental fractures or deep carious lesions.¹ However, the physical trauma of the drill, the diffusion of chemical agents from restorative materials and bacterial products can trigger inflammatory and immune events in the underlying pulp.² With the use of appropriate material, there is control of the local inflammatory response and stimulus for the hard tissue barrier formation and pulp recovery.³⁻⁵ Thus, more extensive procedures, such as endodontic treatment or extraction, are avoided.^{1,6}

The inflammatory process initiated in pulp tissue is crucial to the complex process of pulp repair success. However, the inflammatory process can lead to dental pulp repair, dentin bridge formation, fibrosis or necrosis.^{2,7} The control of the intensity of pulp tissue inflammation is critical to the success of conservative therapies.¹

A pulp protective agent should be biocompatible to preserve pulp tissue vitality, control the local inflammatory response, and stimulate dentinogenesis.¹ The calcium-hydroxide-based cements have been the material of choice for many years for pulp capping therapies,^{1,8,9} however it promotes superficial tissue necrosis and the formed dentin barrier is permeable, presenting multiple tunnel defects, allowing bacterial recontamination.^{10,11} Thus, after the pulp capping therapy some cases evolve to clinical failure and have led to the search for new therapeutic agents.²

The continuous search for new pulp protection materials is required. The use of gold nanoparticles (AuNPs) in dental materials has obtained promising results, especially for their particular properties as its inhibition effect of matrix metalloproteinases (MMPs),¹² and its regulation of the inflammatory response,¹³⁻¹⁵ being the control of the intensity of the inflammatory response a critical factor for the success of pulp tissue therapies.^{1,16-18} The anti-inflammatory effect of AuNPS occurs by the interference with the activation of NF- κ B, decreasing the transcription activity of pro-inflammatory cytokines limiting the activation of the pro-inflammatory pathway of NF- κ B. AuNPs inhibit I κ B-kinases, which are responsible for the activation of NF- κ B through the degradation of its inhibitory portion.¹⁹⁻²¹ Its application in pulp inflammation

is promisor because reducing NF- κ B pathway activity in pulp stem cells suppresses the action of inflammatory mediators on these cells, increasing odontoblastic differentiation and collagen matrix synthesis of repair dentin.²²

The dental pulp is a common colonization and invasion site for *C. albicans*, and AuNPs significantly inhibited *C. albicans* biofilm formation, independent of the synthesis method and inhibit invasion of dental pulp stem cells.²³ When AuNPs were used in combination with methylene blue in photodynamic therapy they were able to inactivate *E. faecalis* cells in planktonic form and in biofilm, synergistically increasing the antimicrobial effect when compared to the isolated use of methylene blue.²⁴ Thus, the use of AuNPs for the treatment of pulp inflammation is justified. The use of ascorbic acid in the synthesis process as a stabilizing agent can increase its properties, because its antioxidant effect, and its use as an *in vitro* mineralization induction factor.^{25,26}

Therefore, the present study aims to perform the physical-chemical characterization of ascorbic acid coated AuNPs, to verify the *in vitro* anti-inflammatory effect of AuNPs, as well as the cytotoxic activity on fibroblasts (3T3), macrophages (J774) and primary cells of the human dental pulp.

Material and Methods

Synthesis of ascorbic acid-coated gold nanoparticles (AuNPs)

The gold nanoparticles were synthesized by the AuCl₄⁻ ions chemical reduction method by the addition of a reducing agent under heating and stirring, as described by Turkevich et al. (1951)²⁷ with some modifications, using ascorbic acid as reducing and stabilizing agent.²⁸ The tetrachlorouric acid solution (1 mM - Sigma–Aldrich®, Missouri, EUA) was heated to 90°C under constant stirring, the ascorbic acid solution (0.48 mg/mL) was added and the system kept under stirring until it became the reddish color characteristic of the gold colloidal dispersion. The synthesis process was performed by the Group of Photothermal Phenomena and Complex Fluids of Physics' Department of the State University of Ponta Grossa. At the end of the synthesis process, the colloidal dispersion of AuNPs acquires the final concentration of 4 mg/ml.

Characterization of AuNPs

After the synthesis of ascorbic acid-AuNPs, samples were used for characterization by Transmission Electron Microscopy (TEM), Ultraviolet-Visible Absorption Spectroscopy (UV-Vis), particle size distribution and Zeta potential. A drop of the sample dispersion was deposited on the carbon-coated grid, dried at room temperature and observed under TEM to analyze the morphology and distribution size of AuNPs, using SEM Jeol 7001TTLS microscope operated at 12 kV and HR-TEM (ARM 200 F) operating at 200 kV.

The surface plasmon resonance (SPR) band of AuNPs was characterized by using UV-Visible spectrophotometer Thermo Scientific Evolution 220 (Waltham, MA, USA), in the range of 400-800 nm.

Cell culture

The cell lines were obtained from the Rio de Janeiro Cell Bank. Murine fibroblast (3T3) and macrophage (J774) strains were cultivated in DMEM medium (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) supplemented with 10% Fetal Bovine Serum (SFB) and 1% penicillin/streptomycin (Induslab®). The culture medium was changed 3 times a week, and both strains had a folding time of 2 to 3 days. Cells were cultured in 75 cm² cell culture flasks and maintained at 36°C in 5% CO₂ and humidified atmosphere.

The primary culture of undifferentiated cells of the human dental pulp (UCHDP) was obtained from third molar pulp tissue newly extracted after clinical indication obtained by the detachment of cells from tissue fragments, following the explant outgrowth technique. Immediately after extraction the tooth was disinfected with 2% chlorhexidine solution and packed in a sterile flask with DMEM culture medium with 10% FBS and 1% antibiotic until transport to the laboratory. In a sterile environment, the tooth was fractured and the pulp tissue removed, fragmented and inserted into 75 cm² cell culture flasks containing DMEM supplemented with 20% Fetal Bovine Serum (FBS) and 1% antibiotic (penicillin and streptomycin). The culture flasks were kept in a 5% CO₂ and 36°C incubator. After the cells reached 70% confluency, the tissue fragments were removed and passed to subcultures. All experiments were performed in triplicate with cells between the 2nd and 4th pass.

Treatments

3T3, J774, and UCHDP were treated using AuNPs dispersions for 24h and 48h for MTT assay and cellular morphology analysis. J774 cells were treated using AuNPs dispersions and LPS (1 $\mu\text{g/ml}$) for 24h for TNF- α release LPS-induced assay. The AuNPs were applied in different concentrations: 400, 200, 100, 50 and 10 $\mu\text{g/ml}$, using SFB-free medium as dispersant, prepared immediately prior to each experiment and sonicated in an ultrasonic bath to avoid particle agglomeration. Control groups were treated with medium (DMEM) AuNPs-free, and cytotoxic control groups were treated with medium (DMEM) with 10% dimethyl sulfoxide (DMSO). One group was treated with 0.49 mg/mL Ascorbic Acid according to the concentration used in the synthesis of AuNPs. The medium was not changed during the incubation periods.

MTT assay for cell viability

Cells were plated in 96-well plates at the ratio of 1×10^4 cells/well in DMEM with 10% of Fetal Bovine Serum (SFB). After 24h, the cells were treated as described in *Treatments* section. After the experimental periods, the MTT solution was added to the wells at 0.5 mg/ml and microplates kept at 36°C in 5% CO₂ for 2h. Subsequently, the crystals were solubilized with the use of DMSO and spectrophotometer readings at a wavelength of 570 nm. Wells that did not receive treatment with AuNPs were used as control, being considered as 100% cell viability. Three independent experiments were performed in triplicate.

Cellular Morphology Analysis by May-Grünwald Giemsa-Stained

As a complementary test, the morphology of the UCHDP was analyzed after 24 and 48h of exposure to AuNPs, looking for possible changes in the cell morphology that indicated material toxicity. Initially, 5000 dental pulp cells were added in 24-well plates containing a coverslip on the bottom and incubated with DMEM at 36°C in 5% CO₂ for 48 h. After this period, the medium was removed and 0,5ml of AuNPs solutions were added and incubated for 24h and 48h. The wells were then washed with PBS, cells were fixed with formaldehyde 2% for 2 minutes and stained with May-Grünwald

Giemsa stain. The group that received no treatment was used as control of normal cell morphology. Two independent assays were performed in duplicate.

TNF- α release LPS-induced in macrophages

The macrophages J774 cells were added in 24-well plates (2×10^5 cells/well) with DMEM + 10% fetal bovine serum (FBS) for 24h at 36°C under 5% CO₂ atmosphere. Then, the medium was removed and 0,5 mL of different concentrations of ascorbic acid-AuNPs solutions (400, 200, 100, 50 and 10 μ g/ml) and LPS at 1 μ g/ml (Lipopolysaccharides from *Escherichia coli* - Sigma Aldrich®). After 24h incubation, the amount of TNF- α released into the supernatant was measured by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) (Mouse TNF alpha ELISA Ready-SET-Go!® 10 x 96 tests w/plates – Thermo Fisher Scientific). Two independent assays were performed in triplicate.

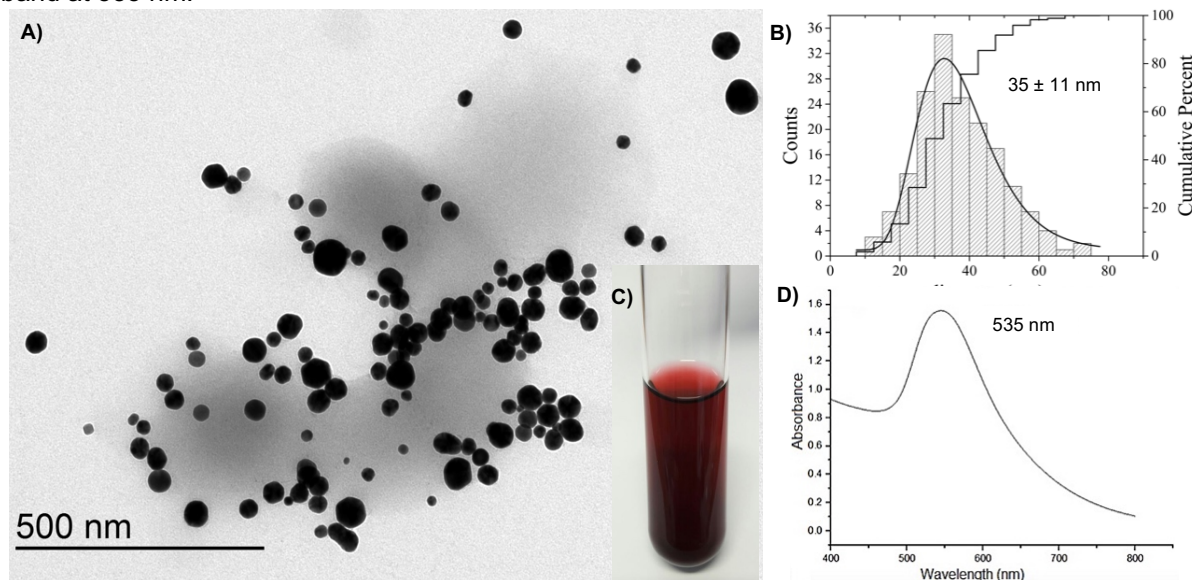
Statistical analysis

Statistical analysis of TNF- α release and cytotoxicity assays were performed using one-way analysis of variance (ANOVA) and the Tukey test for average comparisons, after checking data normality by the Shapiro-Wilk test, in the GraphPad Prism 7.0 program.

Results

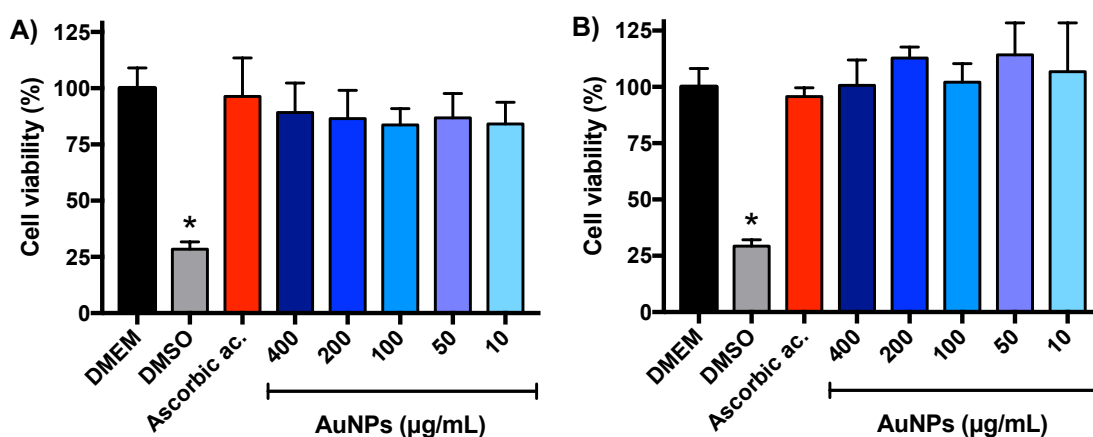
The TEM result presented the spherical shape of ascorbic acid-AuNPs and an average size of 35 ± 11 nm. The UV-Visible Absorption Spectroscopy indicated maximum absorption at 535 nm (figure 5.1).

Figure 5.1 - A) Transmission electron microscopy of ascorbic acid coated AuNPs evidencing its spherical shape. B) Size of 35 ± 11 nm measured by the maximum and minimum method for particle size distribution. C) Aspect of AuNPs dispersion after synthesis process. D) Electron absorption spectrum in the UV-Visible region for the colloidal dispersion of ascorbic acid coated AuNPs. Maximum absorption band at 535 nm.



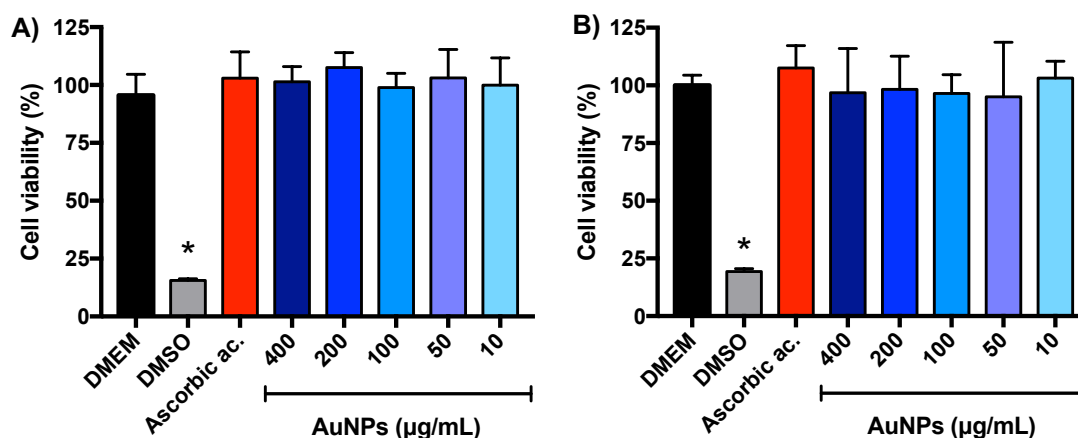
The cytotoxicity assay shows that AuNPs did not alter cell viability in 3T3 fibroblasts (figure 5.2) and J774 macrophages (figure 5.3) after 24 and 48h of exposure. AuNPs did not statistically significantly decrease CIPDH cell viability after 24h exposure at all concentrations tested (figure 5.4a). However, after 48h cell viability was reduced to 75% when treated with 400 $\mu\text{g/ml}$, to 82% with 200 $\mu\text{g/ml}$, and to 84% with 100 $\mu\text{g/ml}$ of AuNPs (figure 5.4b).

Figure 5.2 - Viability percentages of 3T3 fibroblasts after treatment with different concentrations of AuNPs for a) 24h and b) 48h. (n=9).



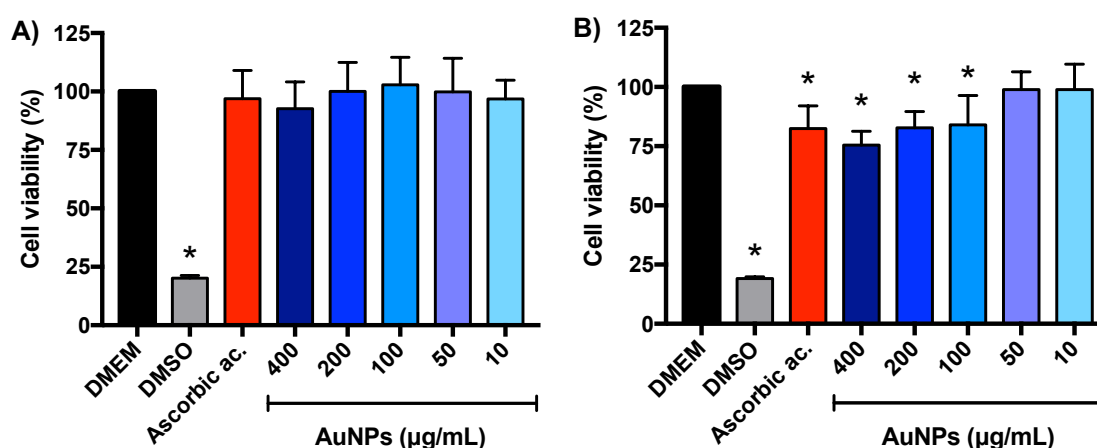
Note: * when $p < 0.05$ compared with control group (DMEM) according to one-way analysis of variance (ANOVA) and Tukey post test.

Figure 5.3 - Viability percentages of J774 macrophages after treatment with different concentrations of AuNPs for a) 24h and b) 48h. (n=9).



Note: * when $p < 0.05$ compared with control group (DMEM) according to one-way analysis of variance (ANOVA) and Tukey post test.

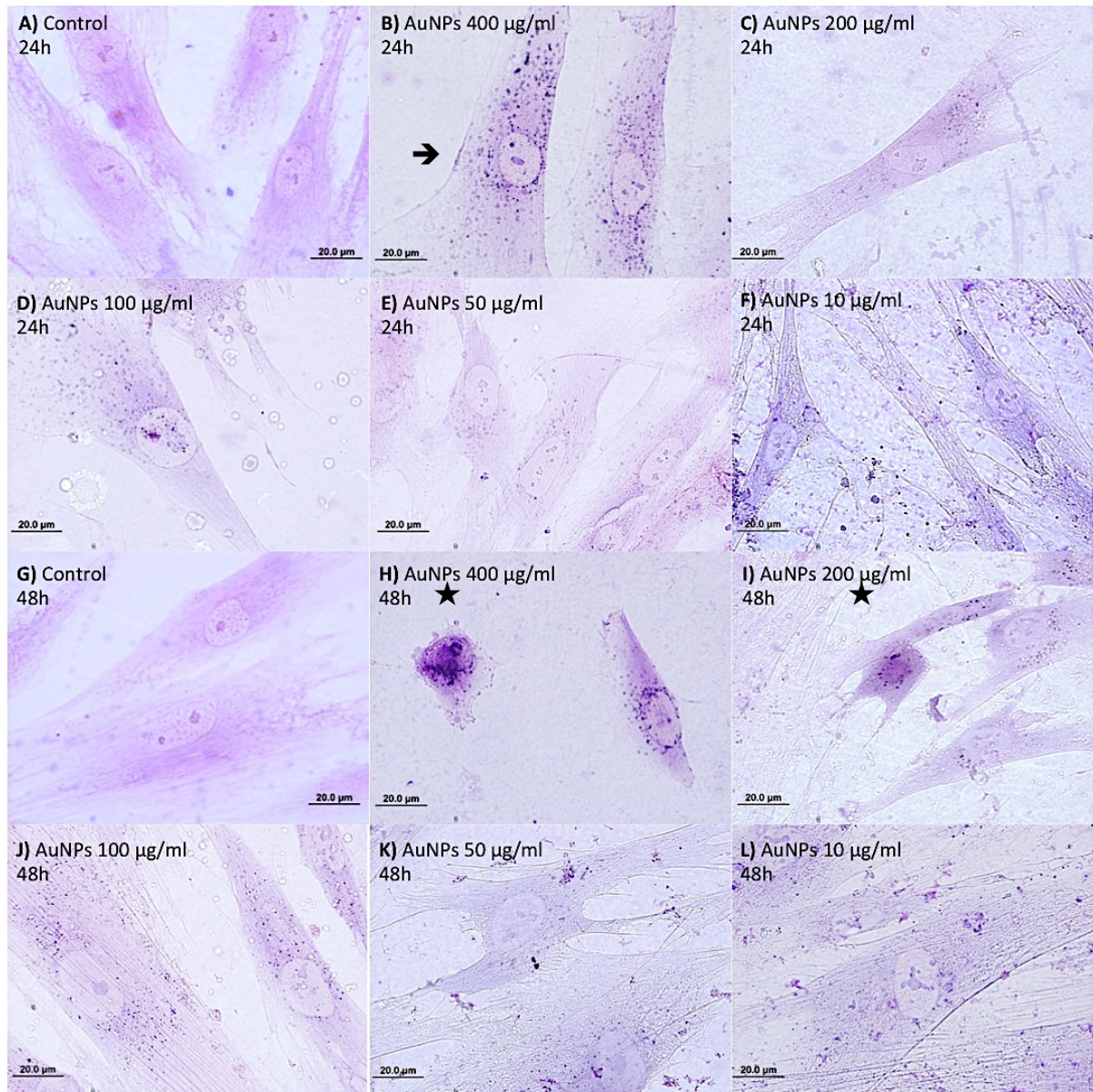
Figure 5.4 - Viability percentages of Undifferentiated Cells of Human Dental Pulp (UCHDP) after treatment with different concentrations of AuNPs for a) 24h and b) 48h. (n=9).



Note: * when $p < 0.05$ compared with control group (DMEM) according to one-way analysis of variance (ANOVA) and Tukey post test.

The morphology of the UCHDP indicated that after 24h of exposure none of the tested concentrations was able to significantly change the morphology of the cells, which remained with intact cytoplasmic prolongations and plasma and nuclear membrane. After 48h of exposure, in samples treated with the two highest concentrations of AuNPs (400 and 200 µg/ml), it was possible to identify some cells with morphological alteration of their exoskeleton, evidenced by the retraction of their extensions, accompanied by nuclear alterations such as chromatin condensation (figure 5.5).

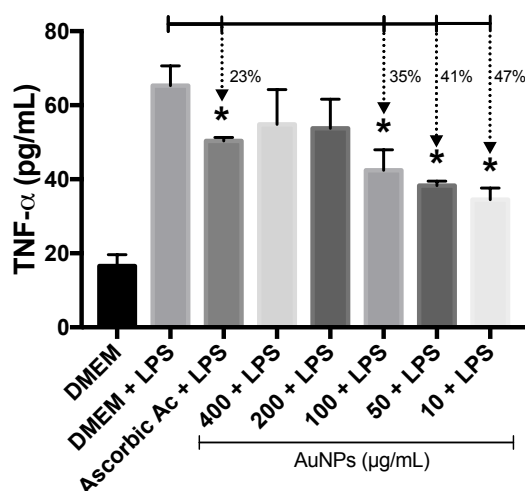
Figure 5.5 - UCHDP morphological analysis after 24h and 48h of AuNPs treatment and May Grünwald-Giemsa stain. condensation, retraction of cytoplasmic extensions and apoptosis process.



Note: Microscopic analysis at 1000x magnification. Analysis demonstrates cells with morphology identical to the control group, with cytoplasmic prolongations, plasma and nuclear membrane integrity. → indicates the presence of accumulation of AuNPs. ★ Indicates cells with chromatin

AuNPs were able to decrease LPS-stimulated TNF- α release in macrophages but only in samples that received the lowest AuNPs concentrations (figure 5.6). AuNPs concentrations of 100, 50 and 10 µg/ml were shown to reduce 35%, 41% and 47% respectively the LPS-induced TNF- α release in macrophages. The group treated with ascorbic acid also showed a decrease of 23% in the TNF- α levels in supernatant.

Figure 5.6 - LPS-induced TNF- α release in macrophages J774 treated with different concentrations of ascorbic acid coated AuNPs.



Note: * when $p < 0.05$ compared with DMEM + LPS group, which receive no treatment, according to one-way analysis of variance (ANOVA) and Tukey post test.

Discussion

Gold is a known biocompatible material, however, its nanoparticulate form allows greater interaction with cells and tissues and may accentuate its toxicity. Despite that, AuNPs were better in terms of biocompatibility and non-cytotoxicity compare to other metallic nanoparticles.³¹ The morphology and size of nanoparticles directly reflect their biological properties and biocompatibility, because the AuNPs cytotoxicity is depending on the particle size, the cell line tested and the nanoparticle capping agent used.^{32,33} Thus, it was essential to evaluate the morphological characteristics of our gold nanomaterial. The AuNPs used in the present study presented the spherical and an average size of 35 ± 11 nm with a maximum absorption at 535 nm, compatible with the particle size and confirming the formation of AuNPs.^{29,30} According to Vijayakumar and Ganesan (2012)³², AuNPs with spherical shape and 35 nm size offer a lower risk of toxicity.

In addition, the size of particle, time of exposure and AuNPs concentration directly impact their biological interaction and the cell uptake.³³ AuNPs could be adhered to the cell membrane and be ingested by cells.³² Specifically, 45 nm AuNPs penetrate cells via clathrin-mediated endocytosis, while the smaller 13 nm enter mostly via phagocytosis.³² Study shows that AuNPs can penetrate the plasma membrane and accumulate in large vacuoles, and the uptake of the AuNPs is a function of time, their

size and concentration.³⁶ Boyoglu et al. (2013)³⁷ showed that 3 nm and 10 nm AuNPs entered the nucleus whereas 25 and 50 nm AuNPs accumulated in cytoplasm around the nucleus. Our morphological analysis of UCHDP suggested an accumulation of AuNPs in the cytoplasm and around the nucleus when incubated with AuNPs dispersion of 400 µg/ml for 24 hours.

Results indicated a dose-dependent and time-dependent toxicity of AuNPs in UCHDP, promoting decreased cell viability and morphological changes in cells after 48h exposure to the three highest concentrations tested. However, as recommended by ISO 10993-5:2009³⁸, to be considered cytotoxic the material needs to reduce cell viability to values below 70%, which did not occur with our material. Thus, AuNPs cannot be considered cytotoxic. It is important to highlight that the morphological changes evidenced in UCHDP treated with AuNPs are characteristic of an apoptotic cell death process, which is an active-controlled process, without exposure of cellular contents to the extracellular environment avoiding an inflammatory response.³⁹ One study found a decrease in proliferation rates of human dermal fibroblasts exposed to AuNPs, and speculate that it occurs as a function of cell apoptosis resulting from the number of vacuoles present in the cells, which may disrupt the cytoskeleton and cause contraction of prolongations and decreased motility. However, it has been shown that the damage caused by AuNPs is not permanent and that cells can recover after AuNPs are removed, depending on size, concentration and exposure time.³⁶

It is already described that AuNPs may play roles in regulating the inflammatory response¹³⁻¹⁵ which makes its inclusion in the formulation of direct pulp capping materials interesting. Although the inflammatory response is fundamental for the recruitment and differentiation of undifferentiated cells in the process of pulp repair and production of mineralized matrix,^{2,40} controlling the intensity of the inflammatory response in the dental pulp is critical to ensure the success of conservative therapies such as direct pulp capping. High levels of proinflammatory cytokines and growth factors may promote pulp cell death and prevent stem cell differentiation.⁴¹ In this context, TNF- α can be considered a marker to determine the extent of pulp inflammation in cases of irreversible pulpitis,⁴² and its expression is associated with the severity of clinical symptoms.⁴³

Proinflammatory mediators involved in pulp and cariogenic diseases, such as TNF- α and IL-1 β together with the bacterial component LPS are able to stimulate the

activation of the NF- κ B pathway, probably through TLRs expressed in human dental pulp cells.^{41,44} Therefore, NF- κ B may be an important target for inhibiting dental inflammation.⁴⁵ Prolonged inflammatory signaling in dental pulp stem cells can difficult odontogenesis and tissue regeneration,²² because TNF- α and IL-1 β decrease collagen synthesis, and promote the degradation of collagen produced by pulp fibroblasts.⁴⁶ Therefore, in vitro study demonstrated that reducing NF- κ B pathway activity in pulp stem cells suppresses the action of inflammatory mediators, increase expression of odontoblastic marker genes stimulating the odontoblastic differentiation and collagen matrix synthesis of repair dentin.²²

Previous studies show that gold compounds have the ability to inhibit NF- κ B activation and consequently the production of proinflammatory cytokines, decreasing the effects of inflammation.¹⁴ Ascorbic acid is the most important physiological antioxidant involved in host defense mechanisms and immune homeostasis.⁴⁷ In this study, ascorbic acid alone was able to decrease the TNF- α release in macrophages stimulated by LPS. Another study found that ascorbic acid potentiated the production of anti-inflammatory cytokines such as IL-4 and IL-10, and downregulated the expression of pro-inflammatory cytokines such as TNF- α , IL-6 and IL-12 in mouse splenocytes.⁴⁷

The present study demonstrated that ascorbic acid coated AuNPs also have an in vitro anti-inflammatory effect. This result was observed with the application of ascorbic acid coated AuNPs in low concentrations, which can decrease the LPS-induced TNF- α release by macrophages, without cytotoxicity effects in this cell line, as well as being biocompatible with undifferentiated human dental pulp cells. AuNPs in concentrations of 400 and 200 μ g/ml were not able to alter the release of TNF- α . This may indicate that high concentrations of AuNPs may promote oxidative stress on macrophages cells, not being sufficient to promote cell death (evidenced by the absence of MTT cytotoxicity results in this strain), but sufficient to limit its anti-inflammatory effect, since oxidative stress can induce cell damage and promote inflammation.^{48,49} Suprapaneni et al. (2018)⁵⁰ found that reactive oxygen species are highly detrimental to cells and can cause oxidative data to lipids, proteins, and DNA and that 30 minutes of AuNPs treatment generated dose-dependent oxidative stress in MDA-MB-231 cells. Besides, oxidants from the state of cellular oxidative stress may activate the NF- κ B leading to the production of mediators that accentuate inflammation

leading to tissue damage.^{48,51} It is worth noting that AuNPs have a pH-dependent stabilization mechanism, and in higher concentrations may tend to aggregate by adsorption of $[\text{AuCl}_4]^-$ on their surface.²⁸ Thus, when particles are aggregated they can have their size increased, which hinders their cell uptake. Thus, AuNPs in lower concentrations may perform better their effect by having the advantage of interacting better with cell membranes, having a higher uptake.⁵²

Despite the beneficial anti-inflammatory effect of AuNPs, inhibition of NF- κ B pathway should be carefully considered because NF- κ B is a major negative regulator of programmed cell death (PCD), especially in response to TNF- α .⁵³ If NF- κ B activation is prevented, as purposed by AuNPs, TNF- α can induce either apoptotic or necrotic cell death,⁵⁴ because TNF- α can induce ROS production triggering apoptosis pathways.⁵⁵ NF- κ B negatively regulates apoptosis by inducing antiapoptotic members of the Bcl2 family and caspase inhibitors.⁵³

Despite the limited interpretation of the in vitro properties of AuNPs, given the above, their use in anti-inflammatory treatment in pulp exposures in animal research is justifiable. These nanoparticles, when stabilized with other agents such as ascorbic acid, are believed to have other advantages when used in dental materials, such as induction of dentin tissue mineralization during direct pulp capping. To this end, this effect can be optimized when used in conjunction with a phosphate source, as B-glycerophosphate and tricalcium phosphate.⁵⁶

Conclusion

Ascorbic acid coated AuNPs are not cytotoxic on 3T3 fibroblasts, J774 macrophages and undifferentiated cells of the human dental pulp. Primary culture demonstrated morphological changes indicative of the apoptosis process, especially after 48 hours of incubation with AuNPs at 400 and 200 $\mu\text{g/ml}$, but without being considered cytotoxic. In addition, low concentrations of ascorbic acid coated AuNPs are capable of downregulating the TNF- α release LPS-induced in macrophages, without cytotoxicity.

References

- 1- HILTON, T.J. Keys to clinical success with pulp capping: a review of the literatura. **Operative Dentistry**, v. 34, n. 5, p. 615-625, 2009.
- 2- GOLDBERG, M.; FARGES, J.C.; LACERDA-PINHEIRO, S.; SIX, N.; JEGAT, N.; DECUP, F.; SEPTIER, D.; CARROUEL, F.; DURAND, S.; CHAUSSAIN-MILLER, C.; DENBESTEN, P.; VEIS, A.; POLIARD, A. Inflammatory and immunological aspects of dental pulp repair. **Pharmacological Research**, v. 58, n. 2, p. 137–147, 2008.
- 3- QUEIROZ, A. M. et al . MTA and calcium hydroxide for pulp capping. **Journal of Applied Oral Science**, Bauru, v. 13, n. 2, p. 126-130, June 2005.
- 4- OLSSON, H.; PETERSSON, K.; ROHLIN, M. Formation of a hard tissue barrier after pulp cappings in humans. A systematic review. **International Endodontic Journal**, v. 39, n. 6 p. 429-42, 2006.
- 5- DELFINO, C.S.; RIBEIRO, C.; VIEIRA, G.F.; BRESSIANI, H.A.A.; TURBINO, M.L. Uso de novos materiais para o capeamento pulpar (hidroxiapatita- HAp e fosfato tricálcico- β -TCP). **Cerâmica**, v. 56, n. 340, p. 381-388, 2010.
- 6- BRISO, André Luiz Fraga et al . Biological response of pulps submitted to different capping materials. **Brazilian Oral Research**, São Paulo , v. 20, n. 3, p. 219-225, Sept. 2006.
- 7- CAVALCANTI, B.N.; RODE, S.M.; FRANÇA, C.M.; MARQUES, M.M. Pulp capping materials exert an effect on the secretion of IL-1 β and IL-8 by migrating human neutrophils. **Brazilian Oral Research**, v. 25, n. 1, p.13-8, 2011.
- 8- ACCORINTE, M.L.; LOGUERCIO, A.D.; REIS, A.; CARNEIRO, E.; GRANDE, R.H.; MURATA, S.S.; HOLLAND, R. Response of human dental pulp capped with MTA and calcium hydroxide powder. **Operative Dentistry**, v. 33, n. 5, p. 488-95, 2008.
- 9- WILLERSHAUSEN, B.; WILLERSHAUSEN, I.; ROSS, A.; VELIKONJA, S.; KASAJ, A.; BLETTNER, M. Retrospective study on direct pulp capping with calcium hydroxide. **Quintessence International**, v. 42, n. 2, p. 165-71, 2011.
- 10- COX, C.F.; SUBAY, R.K.; OSTRO, E.; SUZUKI, S.; SUZUKI S.H. Tunnel defects in dentin bridges: their formation following direct pulp capping. **Operative Dentistry**, v. 21, n. 1, p. 4-11, 1996.
- 11- HEDGE, S.; SOWMYA, B.; MATHEW, S.; BHANDI, S.H.; NAGARAJA, S.; DINESH, K. Clinical evaluation of mineral trioxide aggregate and biodentine as direct pulp capping agents in carious teeth. **Journal of Conservative Dentistry**, v. 20, n. 2, p. 91-95, 2017.
- 12- HASHIMOTO, M.; SASAKI, J.I.; YAMAGUCHI, S.; KAWAI, K.; KAWAKAMI, H.; IWASAKI, Y.; IMAZATO, S. Gold Nanoparticles Inhibit Matrix Metalloproteases without Cytotoxicity. **Journal Dental Research**, v. 94, n. 8, p. 1085-91, 2015.

- 13- JEON, K.I.; BYUN, M.S.; JUE, D.M. Gold compound auranofin inhibits IkappaB kinase (IKK) by modifying Cys-179 of IKKbeta subunit. **Experimental and Molecular Medicine**, v. 35, n. 2, p. 61-66, 2003.
- 14- MA, J.S. et al. Gold nanoparticles attenuate LPS-induced NO production through the inhibition of NF-kappaB and IFN-beta/STAT1 pathways in RAW264.7 cells. **Nitric Oxide**, v. 23, n. 3, p. 214-219, 2010.
- 15- SUMBAYEV, V.V. et al. Gold nanoparticles downregulate interleukin-1beta-induced pro-inflammatory responses. **Small**, v. 9, n. 3, p. 472-7, 2013.
- 16- COOPER, P.R.; TAKAHASHI, Y.; GRAHAM, L.W., et al. Inflammation-regeneration interplay in the dentine-pulp complex. **Journal of Dentistry**, v. 38, n. 9, p. 687-97, 2010.
- 17- FARGES, J.C.; LICHT, B.B.; BAUDOUIN, C.; MSIKA, P.; BLEICHER, F.; CARROUEL, F. Odontoblast control of dental pulp inflammation triggered by cariogenic bacteria. **Frontiers in Physiology**, v. 4, article 326, p. 1-3, 2013.
- 18- GOLDBERG, M.; KELLERMAN, O.; DIMITROVA-NAKOV, S.; HARICHANE, Y.; BAUDRY, A. Comparative studies between mice molars and incisors are required to draw an overview of enamel structural complexity. **Frontiers in Physiology, Craniofacial biology**, v. 5, article 359, p. 1-6, 2014.
- 19- JEON, Y.J.; KIM, Y.K.; LEE, M.; PARK, S.M.; HAN, S.B.; KIM, H.M. Radicol suppresses expression of inducible nitric-oxide synthase by blocking p38 kinase and nuclear factor-kappaB/Rel in lipopolysaccharide-stimulated macrophages. **Journal of Pharmacology Experimental Therapeutics**, v. 294, n. 2, p. 548-54, 2000.
- 20- BONDESON, J.; SUNDLER, R. Auranofin inhibits the induction of interleukin 1 beta and tumor necrosis factor alpha mRNA in macrophages. **Biochemical Pharmacology**, v. 50, n. 11, p. 1753-9, 1995.
- 21- NORTON, S. A brief history of potable gold. **Molecular Interventions**, v. 8, n. 3, p. 120-3, 2008.
- 22- HOZHABRI, N.S.; BENSON, M.D.; VU, M.D.; PATEL, R.H.; MARTINEZ, R.M.; NAKHAIE, F.N.; KIM, H.K.; VARANASI, V.G. Decreasing NF-kB expression. Enhances odontoblastic differentiation and collagen expression in dental pulp stem cells exposed to inflammatory cytokines. **PLoS One**, v. 10, n. 1, p. e0113334, 2015.
- 23- YU, Q.; LI, J.; ZHANG, Y.; WANG, Y.; LIU, L.; LI, M. Inhibition of gold nanoparticles (AuNPs) on pathogenic biofilm formation and invasion to host cells. **Scientific reports**, v. 6, n. 26667, 2016.
- 24- MALISZEWSKA, I.; WRÓBEL, J.; WANARSKA, E.; PODHORODECK, A.; MATCZYSZYN, K. Synergistic effect of methylene blue and biogenic gold nanoparticles against *Enterococcus faecalis*. **Photodiagnosis and photodynamic therapy**, v. 27, p. 218-26, 2019.
- 25- PHUNG, S.; LEE, C.; HONG, C.; SONG, M.; YI, J.K.; STEVENSON, R.G.; KANG, M.K.; SHIN, K.H.; PARK, N.H.; KIM, R.H. Effects of bioactive compounds on

odontogenic differentiation and mineralization. **Journal of Dental Research.**, v. 96, n. 1, p. 107-115, 2016.

26- HUANG, G.T.; SHAGRAMANOVA, K.; CHAN, S.W. Formation of odontoblast-like cells from cultured human dental pulp cells on dentin in vitro. **Journal of Endodontics.**, v.32, n.11, p. 1066-73, 2006.

27- TURKEVICH, J. STEVENSON P.C.; HILLIER, J. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. **Discussions of the Faraday Society**, v.11, p. 55-75, 1951.

28- TYAGI, H.; KUSHWAHA, A.K.; KUMAR, A.; ASLAM, M.M. pH-Dependent synthesis of stabilized gold nanoparticles using ascorbic acid. **International Journal of Nanoscience**, v. 10, n. 04-05, p. 857-860, 2011.

29- RAO, Y.; INWATI, G.K.; SINGH, M. Green synthesis of capped gold nanoparticles and their effect on Gram-positive and Gram-negative bacteria. **Future Science OA**, v. 3, n. 4, p. FSO239, 2017.

30- AMENDOLA, V.; MENEGHETTI, M. Size evaluation of gold nanoparticles by UV-vis Spectroscopy. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 113, n. 11, p. 4277-85, 2009.

31- SHUKLA, R.; BANSAL, V.; CHAUDHARY, M.; BASU, A.; BHONDE, R.R.; SASTRY, M. Biocompatibility of gold nanoparticles and their endocytotic fate inside the cellular compartment: a microscopic overview. **Langmuir**, v. 21, n. 23, p. 10644–10654, 2005.

32- VIJAYAKUMAR, S; GANESAN, S. In Vitro Cytotoxicity Assay on Gold Nanoparticles with Different Stabilizing Agents. **Journal of Nanomaterials**, v. 2012, Article ID 734398, 9 pages, 2012.

33- VIJAYAKUMAR, S.; GANESAN, S. Size-dependent in vitro cytotoxicity assay of gold nanoparticles. **Toxicological & Environmental Chemistry**, v.95, n. 2, p. 277-287, 2013.

34- CLOGSTON, J.D.; PATRI, A.K. Zeta potential measurement. **Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)**, v. 697, p. 63-70, 2011.

35- WU, L.; ZHANG, J.; WATANABLE, W. Physical and chemical stability of drug nanoparticles. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 63, n. 6, p. 456-69, 2011.

36- MIRONAVA, T.; HADJIARGYROU, M.; SIMON, M.; JURUKOSVI, V.; RAFAILOVICH, M.H. Gold nanoparticles cellular toxicity and recovery: effect of size, concentration and exposure time. **Journal Nanotoxicology**, vol 4, p. 120-137, 2010.

37- BOYOGLU, C.; HE, Q.; WILLING, G.; BOYOGLU-BARNUM, S.; DENNIS, V.A.; PILLAI, S.; SINGH, S.R. Microscopic studies of various sizes of gold nanoparticles and their cellular localizations. **ISRN Nanotechnology**, 13 pages, 2013.

- 38- INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARIZATION. ISO 10993-5: **Biological evaluation of medical devices: Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity.** p. 24. 2009.
- 39- MEER, F. J. VAN DER. Apoptosis and necrosis induced changes in light attenuation measured by optical coherence tomography. **Lasers in Medical Science**, v. 25, p.259–267. 2010.
- 40- GOLDBERG, M.; NJEH, A.; UZUNOGLU, E. Is pulp inflammation a prerequisite for pulp healing and regeneration? **Mediators of Inflammation**. v. 2015, Article ID 347649, 11 pages, 2015.
- 41- COOPER, P.R.; HOLDER, M.J.; SMITH, A.J. Inflammation and Regeneration in the Dentin-Pulp Complex: A Double-edged Sword. **Journal of Endodontics**, v. 40, n. 4, p. S46–S51. 2014.
- 42- ZELJ-RIBARIC, S.; ANIC, I.; BREKALO, I.; MILETIC, I.; HASAN, M.; SIMUNOVIC-SOSKIC, M. Detection of tumor necrosis factor alpha in normal and inflamed human dental pulps. **Archives of Medical Research**, v. 33, n. 5, p. 482-4, 2002.
- 43- KOKKAS, A.B.; GOULAS, A.; VARSAMIDIS, K.; MIRTsou, V.; TZIAFAS, D. Irreversible but not reversible pulpitis is associated with up-regulation of tumour necrosis factor-alpha gene expression in human pulp. **International Endodontic Journal**, v. 40, n. 3, p. 198-203, 2007.
- 44- PATEL, M.; SMITH, A.J.; SLOAN, A.J.; et al. Phenotype and behaviour of dental pulp cells during expansion culture. **Archives of Oral Biology**, v. 54, p. 898-908, 2009.
- 45- CHANG, J.; ZHANG, C.; TANI-ISHII, N.; SHI, S.; WANG, C.Y. NF-kappaB activation in human dental pulp stem cells by TNF and LPS. **Journal of Dental Research**, v. 84, n. 11, p. 994-8, 2005.
- 46- WISITHPHROM, K.; WINDSOR, L. The Effects of Tumor Necrosis Factor- α , Interleukin-1 β , Interleukin-6, and Transforming Growth Factor- β 1 on Pulp Fibroblast Mediated Collagen Degradation. **Journal of Endodontics**, v. 32, n. 9, p. 853-861, 2006.
- 47- KONG, E.H.; MA, S.Y.; JEONG, J.Y.; KIM, K.H. Effects of L-ascorbic acid on the production of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines in C57BL/6 mouse splenocytes. **Kosin Medical Journal**, v.30, p. 41-49, 2015.
- 48- HADDAD, J.J. Oxygen-sensitive pro-inflammatory cytokines, apoptosis signaling and redox-responsive transcription factors in development and pathophysiology. **Cytokines Cellular & Molecular Therapy**, v. 7, n. 1, p. 1-14, 2002.
- 49- FISHER, R.; MAIER, O. Interrelation of oxidative stress and inflammation in neurodegenerative disease: Role of TNF. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, vol. 2015, Article ID 610813, 18 pages, 2015.

- 50- SUPRAPANENI, S.K.; BASHIR, S.; TIKOO, K. Gold nanoparticle-induced cytotoxicity in triple negative breast cancer involves different epigenetic alterations depending upon the surface charge. **Scientific Reports** 8, article 12295, 2018.
- 51- ADCOCK, I.M.; BROWN, C.R.; KWON, O.; BARNES, P.J. Oxidative stress induces NF kappa B DNA binding and inducible NOS mRNA in the human epithelial cell line A549. **Biochemical Society Transactions**, v. 22, n. 2, p.186S, 1994.
- 52- CHITHRANI, B.D.; GHAZANI, A.A.; CHAN, W.C. Determining the size and shape dependence of gold nanoparticle uptake into mammalian cells. **Nano Letters**, v. 6, n. 4, p. 662-8, 2006.
- 53- KARIN, M., LIN, A. NF- κ B at the crossroads of life and death. **Nature Immunology**, v. 3, n. 3, p. 221–227, 2002.
- 54- FIERIS, W.; BEYAERT, R.; DECLERCQ, W.; VANDENABEELE, P. More than one way to die apoptosis, necrosis and reactive oxygen. **Oncogene**, v. 18, n. 54, p. 7719-30, 1999.
- 55- KIM, J.J.; LEE S.B.; PARK, J.K.; YOO, Y.D. TNF- α -induced ROS production triggering apoptosis is directly linked to Romo1 and Bcl-XL. **Cell Death & Differentiation**, v. 17, p. 1420–1434, 2010.
- 56- LANGENBACH, F.; E HANDSCHEL, J. 2013 Effects of dexamethasone, ascorbic acid and β -glycerophosphate on the osteogenic differentiation of stem cells in vitro. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 4, n. 5, p.117, 2013.

5.2 ARTIGO 2: VALIDATION OF THE LASER-DOPPLER FLOWMETRY METHOD FOR DIAGNOSIS OF PULP INFLAMMATION AND NECROSIS ON MAXILLARY FIRST MOLARS OF RATS

SANSON, M.A.S.^{1,3}; HULLER, D.¹; OTUKI, M.F.²; SANTOS, F.A.³

¹ PhD student of Odontology - State University of Ponta Grossa

² Professor of Department of Pharmacology - Federal University of Paraná

³ Professor of Department of Odontology - State University of Ponta Grossa

Abstract:

Introduction: Accurate pulp diagnosis is essential for the choice and success of treatment in endodontics. Clinically, Laser-Doppler Flowmetry (LDF) is the gold standard for pulp diagnosis and can contribute to animal research for the development of dental materials. However, it is necessary to perform the validation of the method in animals. **Objective:** To verify the ability of LDF to diagnose pulp inflammation and pulp necrosis in the maxillary first molars of Wistar rats. **Material and methods:** Initially 10 female Wistar rats were subjected to gauging of pulp blood flow (PBF) by 2 operators at 2 different times, with readings freely positioned on the occlusal surface of the tooth and with the aid of 4 types of guides. The method of measurement with the lowest

intra- and inter-examiner coefficient of variation was chosen and checked by Bland-Altman concordance analysis. In sequence 7 animals were used for the pulp inflammation model and 7 animals for the pulp necrosis model, being performed readings of the basal, immediate, 6 hours, 24 hours and 48 hours for the animals of pulp inflammation and basal, immediate, 3 days, 5 days, 7 days, 14 days and 21 days for the animals of pulp necrosis. After the experimental period, the animals were sacrificed and the PBF values compared to the histopathological diagnosis, generating a ROC curve and cut-off values for the diagnosis of pulp conditions. **Results:** The readings without guide showed greater intra- and inter-examiner reproducibility. In teeth with pulp inflammation, PBF values increased $35\% \pm 10.7$ and $34\% \pm 10.2$ after 6h ($p = 0.0334$) and 48h ($p = 0.0491$), respectively, compared to the immediate measurement. In teeth with pulp necrosis the PBF values decreased $39\% \pm 5.6$ after 21 days ($p = 0.0006$). The ROC curve for the diagnosis of pulp necrosis showed an area under the ROC curve of 0.899. Animals with PBF values below 17.2833 were diagnosed with pulp necrosis at a sensitivity of 100%, specificity of 90%, and accuracy rate of 95%. However, for the diagnosis of pulp inflammation, the area value under the ROC curve was 0.636 without difference in the diagonal of the null hypothesis. **Conclusions:** Laser-Doppler flowmetry was able to differentiate between vital and non-vital pulp (necrosis) in the maxillary first molars of rats, but it was not sensitive and specific enough to accurately diagnose pulp inflammation.

Keywords: Laser-Doppler Flowmetry; dental pulp necrosis; ROC curve; validation studies; animal models.

Introduction

An accurate assessment of the state of the health of the dental pulp is a key step for the successful diagnosis and treatment in endodontic.¹ Physical, chemical and biological aggressions in dental structure can trigger inflammatory and immune events in the underlying pulp, in a complex defensive mechanism to maintain the integrity and health of the dental pulp. However, the inflammatory response may lead to pulp repair or proceed to a marked and irreversible inflammatory process or even tissue necrosis.^{2,3} A low intensity and short-term inflammatory response is crucial to stimulate the repair process, as regenerative steps only occur after remission of the inflammation.^{2,4} Thus, after employing conservative pulpal therapies, it is important to monitor pulpal integrity over time, looking for signs of inflammation or necrosis of the tissue.

The patient's symptomatic history, radiographic examination, and thermal and electrical pulp sensitivity tests are often used to aid in pulp diagnosis but do not always reflect the actual histological condition of the tissue.⁵ Many cases of chronic pulp inflammation are clinically asymptomatic.⁶ During the pulp inflammatory process, the

action of mediators promotes microcirculatory hemodynamic changes in the tissue.^{7,8} Thus, a pulp vitality test that assesses tissue microcirculation, such as Laser-Doppler Flowmetry (LDF), is much more promising and accurate and can be used as a gold standard alone.¹

Many studies use LDF to assess blood flow in the dental pulp micro vascularization of patients.⁹⁻¹² This is more reliable and effective than tests such as pulse oximetry electrical test.⁹

In the LDF technique, through an optical fiber, a coherent light is shone on the biological tissue, which can be absorbed, transmitted, reflected or scattered. If the light is scattered by moving particles, such as red blood cells, this will lead to a change in the frequency of scattered light compared to incident light, proportional to the speed of that motion, known as the Doppler effect.^{13,14} This scattered light is detected by another optical fiber and guided to the photodetector of the device, converting this radiation into electrical signals, which are processed and presented as blood flow values, flow velocity and average red cell concentration in arbitrary units.¹⁴⁻¹⁶ The laser penetration depth depends on the wavelength of the light used. Lasers with wavelengths in the red area ($\lambda = 630$ to 740 nm) can reach greater depths, reaching between 600 and 1000 μm .^{13,17-19}

Studies in animal models also evaluate changes in pulp microcirculation as the main outcome.²⁰⁻²³ The animal model with rats is one of the most used for these studies, and generally, the histopathological analysis of the samples will determine the diagnosis of the pulp condition. Thus, it would be of great contribution for future research the establishment of a sensitive and specific method for pulp vitality evaluation in molars of rats, allowing its real-time evaluation with the live animal, and does not depend on the animal's response, which may be offered by LDF.

Some studies have also used LDF to assess pulp micro-vascularization in rat mandibular incisors,^{23,24} however with a brief description of the technique, making it difficult to reproduce. Despite, as rat incisors do not meet all types of research, because these teeth have unique characteristics of a rodent animal (such as the constant eruption process allowed by the permanent presence of ameloblasts promoting enamel formation), many studies use rat molars (which have a limited eruption process) in an attempt to approximate the condition found in humans.^{25,26} However, it is still necessary to establish a reproducible, sensitive and specific protocol for LDF in rat molar pulp. Thus, the present study aims to validate the noninvasive LDF

method in maxillary first molars of rats as a diagnostic method of pulp inflammation and pulp necrosis, evaluating the sensitivity, specificity, and accuracy of the method.

Material and Methods

Experimental Design

Twenty-seven female Wistar rats (*Rattus norvegicus, albinus Wistar*) between 2 and 3 months weighing 200-250g. The animals were kept in a bioterium, with a climate environment at 22°C, with access to a balanced diet and free water. The experiments were performed according to the ethical principles of COBEA (Brazilian College of Animal Experimentation) and approved by the local Ethics Committee in animal research under protocol nº 045/2017. The use of females was preferred because of the need to use the guides throughout the experimental period, with the females having a less pronounced growth, allowing a better fit of the guides for a longer period of time.

At first 10 rats were used to standardize the LDF method. After anesthesia it was be measured the pulpal blood flow (PBF) of the right and left maxillary first molars of rats using LDF. The probe was placed on the occlusal side of the tooth with and without the use of flexible and rigid guides to guide your positioning. Individual guides (made for each animal) and universal guides (the same guide used for all animals) were tested. The individual guides were made on the cast model of each animal, and the individual guide that obtained the most reproducible results was later used as a universal guide for all animals. The data were analyzed and determined the method that provided the most stable and reproducible results indicated by the lower coefficient of variation.

Then, 17 animals were divided into 3 groups (n = 5 per group) to receive different treatments to establish inflamed and necrotic pulp models and naive groups.

- Naive Group: no pulp exposure and no treatment. Five animals were followed for 21 days.
- Pulp inflammation group: pulp exposure, no treatment, and cavity closure. The pulp exposure procedure was performed in the maxillary first molars, but no pulp protective material was applied. A sterile cotton ball was inserted over the

exposure region and the cavity was closed with light-cured glass ionomer. Five animals were followed for 48 hours.

- Pulp necrosis group: pulp exposure without treatment and open cavity. The pulp exposure procedure was performed in the maxillary first molars. The tissue received no pulp protective material and the cavity was left open throughout the experimental period. Five animals were followed for 21 days.

Two animals were used for a brief descriptive histopathological analysis after 24h in pulp inflammation group and after 14 days in pulp necroses group, wich were not considered in the statistical analyzes.

After the procedures, the animals were submitted to the measurement of the PBF by LDF following the protocol defined in the standardization step. Thus, the PBF values were compared with the histopathological diagnosis of pulp tissue in order to perform the ROC curve for method validation and to establish the cutoff values for pulp inflammation and necrosis, as well as the sensitivity and specificity values of LDF as a diagnostic method of pulp vitality.

Preparation and validation of guides:

Before starting the flowmetry measurements for method validation, the insertion guides of the laser Doppler probe were made. For this, an acrylic resin tray was made on a plaster model obtained from the dried rat skull (discarded animal from another experiment of our research group). Subsequently, one of the animals was anesthetized with 4% chloral hydrate at the dose of 400 mg/kg and molded with polyether to obtain a model of gypsum of the animal's jaw. On this model of plaster, a relief was carried out with wax n. 7 and individual trays were made for all animals. In the next session, 10 animals were anesthetized and molded with polyether to obtain individual models of the maxilla of each animal cast with type IV gypsum. From these models were made the flexible silicone rubber guides and the rigid acrylic resin guides. For each animal, 2 flexible guides and 2 rigid guides were used, which guided the positioning of the Doppler laser on the first right and left first molars in the occlusal position. For the preparation of the guides, the probe was positioned to encompass only the dental surface and was held in place while the material (silicone or acrylic resin) was deposited around the probe to register its position relative to the teeth. The silicone guides were cut and the acrylic resin was worn, extending to the buccal groove bottom

region in the molar region, and then limited to the end of the hard palate and anteriorly to the first palatine groove. With the guides ready, the animals were sedated again, and the guides of each position tested in order to validate them. For its validation, graphite was inserted into the guidewire to verify that the labeling was restricted to the dental structure of the maxillary first molar. In addition, it was verified whether the values obtained with the Laser-Doppler were stable and consistent with the flowmetry of the tooth structure with healthy pulp as observed in a pilot study (with values between 15 and 30 AU). If the guide was providing discrepant values or was positioning the Laser-Doppler probe on the mucosa, a new guide was prepared and tested in a new session for validation.

Standardization of laser-Doppler flowmetry of maxillary first molar tooth pulp

In the present study, a MoorVMS-LDF1 semiconductor diode LDF monitor was used, which uses a wavelength of $785\text{nm} \pm 10\text{nm}$, with divergent beam light emission from the optical probe, with an aperture of 0.5 to 1.2 mW, 26-degree angular dispersion with 0.22 numerical aperture of 200-micron silica fiberglass, according to respective manual.

Before each measurement, the animals were anesthetized with 4% chloral hydrate at a dose of 400 mg/kg intraperitoneally. Before the session of measurements, the probe of the laser-Doppler device was calibrated as indicated by the equipment manual, always using the same probe in all the readings. For the validation of the method, all the animals were submitted to two sessions of LDF of the first maxillary molars with an interval of 1 week between each one. The measurements were always performed by 2 different operators in order to analyze the reproducibility of the intra and inter-examiner data. Each operator made 3 records of at least 1 minute with different methods, unguided readings and guided readings with individuals and universal flexible guides (made of addition silicone) and individuals and universal rigid guides (made of acrylic resin) for probe positioning. For each record, the median value of PBF was calculated considering the ten seconds most stable at the beginning, middle and end of the record. Data were collected from blood flow (Flux), moving blood volume (Conc) and light intensity (DC). The PBF value of each animal in each session was obtained by averaging the values of the right and left maxillary first molars. For each session, the average of the three PBF registers of each operator was made.

Afterward the data were analyzed, being chosen the best technique of measurement of PBF of the maxillary first molars and the use or not of the individuals or universal guides that provided the most stable and reproducible data.

Pulp inflammation and necrosis model

The pulp inflammation model was established through the coronary opening and pulp exposure without the application of any pulp capping agent, isolation of the exposed region with sterile cotton, and cavity restoration described by TRONGKIJ, et al.²⁷ with modifications. For the necrosis model, the same pulp exposure procedure was performed, but the cavity was left open. After weighing, the animals were sedated by intraperitoneal administration of 4% chloral hydrate solution at a dose of 400 mg/kg. Then the animals were positioned on a surgical table that allows their mouth opening and access to the upper teeth. The operative field was disinfected with 2% chlorhexidine solution. The entire pulp chamber access and capping procedure was performed with relative isolation. With the aid of 1012 diamond spherical burs and saline irrigation, class I cavities were prepared in the occlusal surface of the first maxillary molars. The cavities were about 1 mm deep and in diameter, reaching as close as possible to the dental pulp leaving only a thin layer of dentin. With the aid of a disposable hypodermic needle, the layer of dentine was perforated, the pulp tissue exposed, and hemostasis was performed with compression with sterile cotton balls and saline solution. Next, a piece of sterile cotton was placed over the exposed pulp region. At the end the cavity was restored with light-cured glass ionomer. The antagonist tooth was slightly worn to avoid occlusal overload on the operated tooth and the fall of the restoration.

Laser-Doppler flowmetry recording of maxillary first molar pulp after inflammation and necrosis induction:

At this time the measurements were performed according to the results of the validation tests, which indicated the use or not of guides for the positioning of the probe. Prior to each measurement, the animals were anesthetized with 4% chloral hydrate solution at 400 mg/kg intraperitoneally. LDF measurements of the maxillary first molars were performed immediately before pulp exposure, to obtain the baseline PBF value

of each tooth of each animal, and immediately after pulp exposure. Then, LDF of the teeth was periodically measured: after 6, 24, and 48 hours for the pulp inflammation group, and after 7, 14, and 21 days for the pulp necrosis group.

Three 1-minute readings were taken on each tooth. For each record, the median of PBF was calculated considering the 10 most stable seconds at the beginning, middle and end of the record. For each session, the median of 3 records of PBF was registered for each tooth.

Animal euthanasia and sample collection

After the experimental period of 48h (for pulp inflammation group) and 21 days (for pulp necrosis group), the animals were sedated with 4% chloral hydrate at 400 mg/kg intraperitoneally, followed by cervical dislocation. The maxilla was removed with the treated teeth of each animal, which was divided into two hemimaxyls, which resulted in a sample of 10 hemimaxyls per group.

Histological analysis for pulp condition diagnosis

Hemimaxyls referred for histology were fixed in 10% formalin solution for 48 hours and decalcified with 9% EDTA solution for 4 weeks. The samples were histologically processed and prepared for inclusion in paraffin with the vestibular face parallel to the cut plane. Serial cuts of 6 μ m thickness were stained with Hematoxylin and Eosin, and 3 cuts were analyzed for each sample. The descriptive histological analysis was used to verify the morphological aspects of pulp response, considering the intensity of inflammation, type of inflammatory infiltrate (polymorphonuclear or mononuclear), organization of the odontoblasts layer and mineralized matrix formation, and presence of necrotic tissue.²⁸⁻³⁰ The cuts were analyzed by a single trained blind operator, and a histopathological diagnoses was determined: healthy vital pulp tissue, inflamed pulp tissue and necrotic pulp tissue.

Analysis of the discriminative power of laser-Doppler flowmetry for pulp condition diagnosis

To evaluate the discriminatory power of LDF in the diagnosis of pulp condition (inflammation and necrosis) in maxillary molars of rats, the Receiver Operating Characteristic (ROC) curve of the test was performed and the PBF values cutoff point was established for the diagnosis of inflammation and necrosis, which provided the best combination of sensitivity and specificity values. The histopathological analysis was used as gold standard for method comparison, being the definitive diagnostic method of the pulp condition. After cutting points found, the pulp condition diagnoses obtained by the LDF of each tooth were compared with the respective histopathological diagnosis, determining the number of true positives/negatives and false positives/negatives. These data were tabulated in a contingency table to evaluate the interrelation between methods (flowmetry and histological analysis) according to the scheme described in table 5.1.

Table 5.1 - Example of contingency table used for test validation, through the analysis of the interrelation between the experimental method (laser-Doppler flowmetry) and the standard method (histopathological analysis).

Laser-Doppler Flowmetry	Histopathology (gold standard)		
	POSITIVE (necrosis)	NEGATIVE (vital)	TOTAL
<i>POSITIVE (necrosis)</i>	A	B	A + B
<i>NEGATIVE (vital)</i>	C	D	C + D
TOTAL	A + C	B + D	N (A + B + C + D)
Calculations for Test Validation			
<i>Sensitivity</i>	A / (A+C)		
<i>Specificity</i>	D / (B+D)		
<i>Predictive Value +</i>	A / (A+B)		
<i>Predictive Value -</i>	D / (C+D)		
<i>Accuracy</i>	(A+D) / N		

Statistical analysis

At first was verified the coefficient of variation of the PBF data obtained by the different methods (without a guide, with flexible and rigid individual guides and flexible and rigid universal guides). The method with the lowest intra and inter-examiner coefficient of variation was adopted as the most reproducible. Afterward, the Bland-Altman agreement test was evaluated to assess the reproducibility of intra and inter-examiner data, always applied together with the t-test for one sample (evaluating the difference of the hypothetical value 0 measurements). Values of $p < 0.05$ were

considered indicative of statistical significance. The tests were performed using GraphPad Prism 7.0 statistical software.

The method that indicated the lowest coefficient of variation of the data and showed good agreement by the Bland-Altman test was used for PBF analysis in the inflammation and pulp necrosis models. The PBF variations in pulp inflammations and necrosis models over experimental time were analyzed by repeated-measures ANOVA test followed by Tukey post-test.

The ROC curve of the test was performed to evaluate the discriminatory power of LDF in the diagnosis of pulp condition, and the PBF values cutoff point was established for the diagnosis of inflammation and necrosis. To obtain the ROC curve the SPSS statistical software was used.

Using the cutoff values indicated on the ROC curve, the pulp condition diagnoses obtained by the LDF of each animal were compared with the respective histopathological diagnosis, and the data were tabulated in a contingency table to perform the test validation calculations (sensitivity, specificity, positive and negative predictive value and test accuracy). The ROC curve and contingency table were performed to diagnose the pulp condition of inflammation and necrosis.

Results

Intra and inter-examiner reproducibility in different methods

To determine the most reproducible method of LDF of the first molars of rats, the mean and standard deviation values of PBF obtained by each method for each animal were calculated, considering the mean of the right and left first molars as the mean of the animal. From the ratio of standard deviation values and mean data, the coefficient of variation values of each method was calculated for each examiner separately (intra-examiner reproducibility) and also for both examiners together (interexaminer reproducibility) (table 5.2). Thus, the flowmetry readings performed without a guide showed the lowest values of coefficient of variation for examiners 1 (16.09%) and 2 (12.44%) alone, and for both examiners together (14.45%).

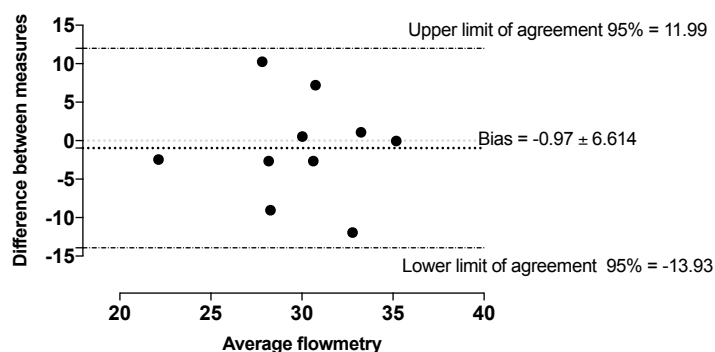
Table 5.2 - Mean, standard deviation and coefficient of variation of PBF values obtained by examiner 1, examiner 2 and both examiners by the different methods.

Pulpal Blood Flow (PBF)			
Examiner 1	DP	Average	Coefficient of variation (%)
Without guide	4.81	29.90	16.09
Individual Flexible Guide	6.98	35.67	19.58
Individual Rigid Guide	10.00	36.45	27.44
Universal Flexible Guide	7.06	35.11	20.12
Universal Rigid Guide	6.18	35.78	17.26
Examiner 2	DP	Average	Coefficient of variation (%)
Without guide	3.97	31.88	12.44
Individual Flexible Guide	5.01	31.01	16.17
Individual Rigid Guide	7.34	32.39	22.66
Universal Flexible Guide	4.63	31.70	14.60
Universal Rigid Guide	5.76	32.05	17.96
Both examiners	DP	Average	Coefficient of variation (%)
Without guide	4.47	30.89	14.45
Individual Flexible Guide	6.45	33.34	19.34
Individual Rigid Guide	8.90	34.42	25.85
Universal Flexible Guide	6.14	33.40	18.39
Universal Rigid Guide	6.19	33.91	18.25

Agreement analysis between the measurements obtained without a guide

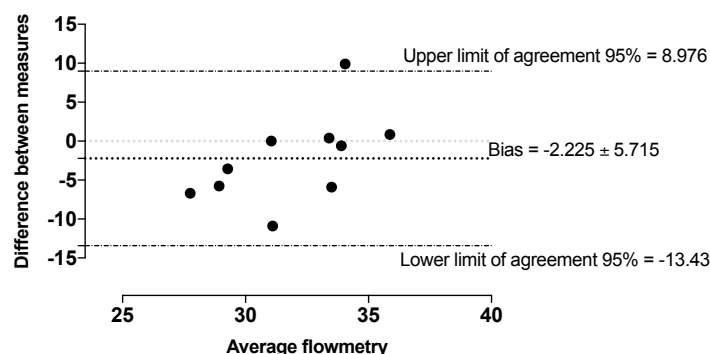
Subsequently, the Bland-Altman agreement analysis was performed between the PBF data of the first molars measured without a guide at two different times. The measurements performed by examiner 1 were within the limits of agreement and had a perfect correlation, indicated by the absence of statistical difference between measurements and the hypothetical value 0 ($p=0.6538$) (figure 5.7). Most examiner 2 measurements were also within the limits of agreement and had a perfect correlation ($p=0.2495$) (figure 5.8). Analyzing together the measurements of both examiners, the values were also within the limits of agreement and had a perfect correlation between the values ($p=0.0626$) (figure 5.9).

Figure 5.7 - Intra-examiner agreement analysis (examiner 1) of laser-Doppler flowmetry measurements obtained from maxillary molars at 2 different times with a 7-day interval.



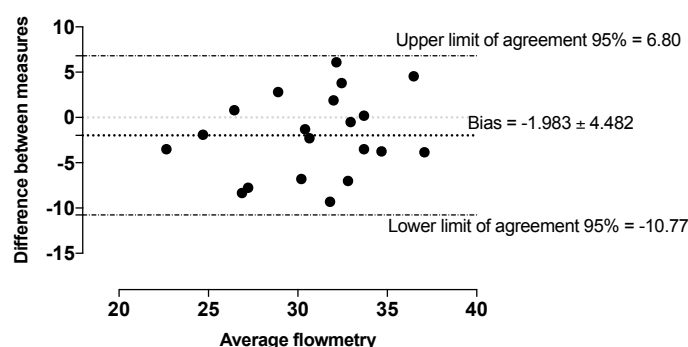
Note: All points within the limits of agreement (Bland-Altman Method). Non-significant difference ($p = 0.6538$) between the measurements and the hypothetical value 0 (perfect correlation) analyzed by the t-test for one sample ($n=10$).

Figure 5.8 - Intra-examiner agreement analysis (examiner 2) of laser-Doppler flowmetry measurements obtained from maxillary molars at 2 different times with a 7-day interval.



Note: Most points within the limits of agreement (Bland-Altman Method). Non-significant difference ($p = 0.2494$) between the measurements and the hypothetical value 0 (perfect correlation) analyzed by the t-test for one sample ($n=10$).

Figure 5.9 - Inter-examiner agreement analysis of laser-Doppler flowmetry measurements obtained from maxillary molars of rats at 2 different times 7-days interval.

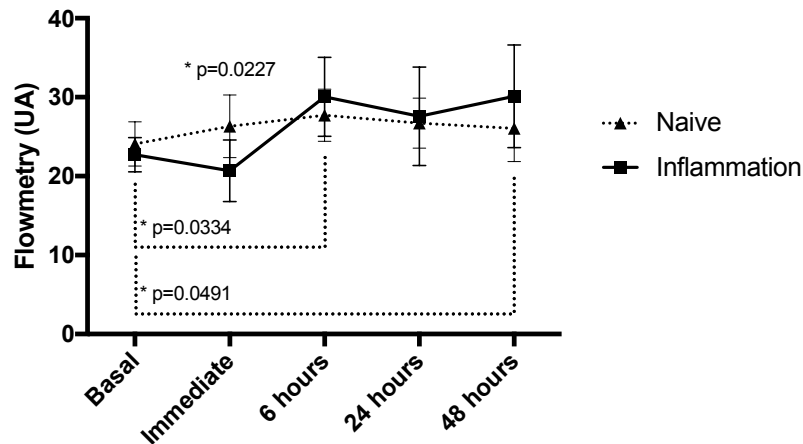


Note: All points within the limits of agreement (Bland-Altman Method). Non-significant difference ($p = 0.0626$) between the measurements and the hypothetical value 0 (perfect correlation) analyzed by the t-test for one sample ($n=10$).

Pulpal blood flow variations after inflammation and necrosis models

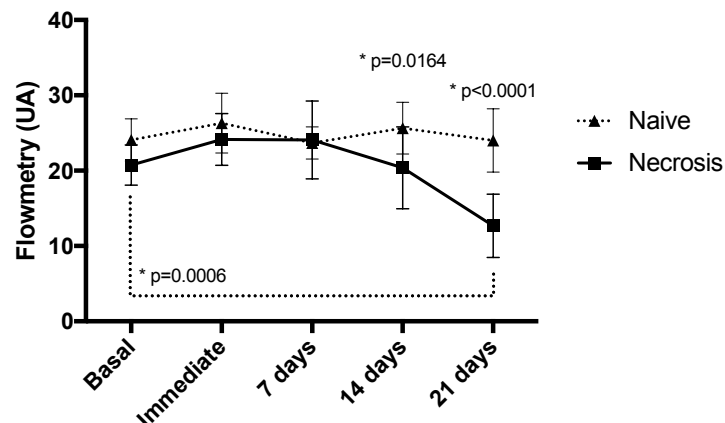
PBF of the maxillary first molars were followed throughout the experimental period of inflammation and necrosis as shown in figure 5.10 and 5.11 respectively. In teeth with pulp inflammation, PBF values showed statistically significant changes after 6h (22.71 to 30.06 [$p=0.0334$]) and 48h (22.71 to 30.12 [$p=0.0491$]) compared to basal measurement after pulp exposure and restoration, with an increase in PBF of $35\% \pm 10.7$ (EPM) and $34\% \pm 10.2$ (EPM), respectively. In teeth with pulp necrosis, the PBF values decreased $39\% \pm 5.6$ (EPM) after 21 days (23.3 to 10.2 [$p=0.0006$]).

Figure 5.10 - Pulpal blood flow (PBF) variations in model of pulp inflammation during the experimental period.



Note: * above when $p < 0.05$ compared to the same period in naïve group. Data analyzed by to-way ANOVA test followed by Bonferroni post test. * below when $p < 0.05$ compared to basal reading after pulp exposure. Data analyzed by repeated measures ANOVA test followed by Tukey post test. $n=10$ (2 teeth from 5 animals).

Figure 5.11 - Pulpal blood flow (PBF) variations in model of pulp necrosis during the experimental period.



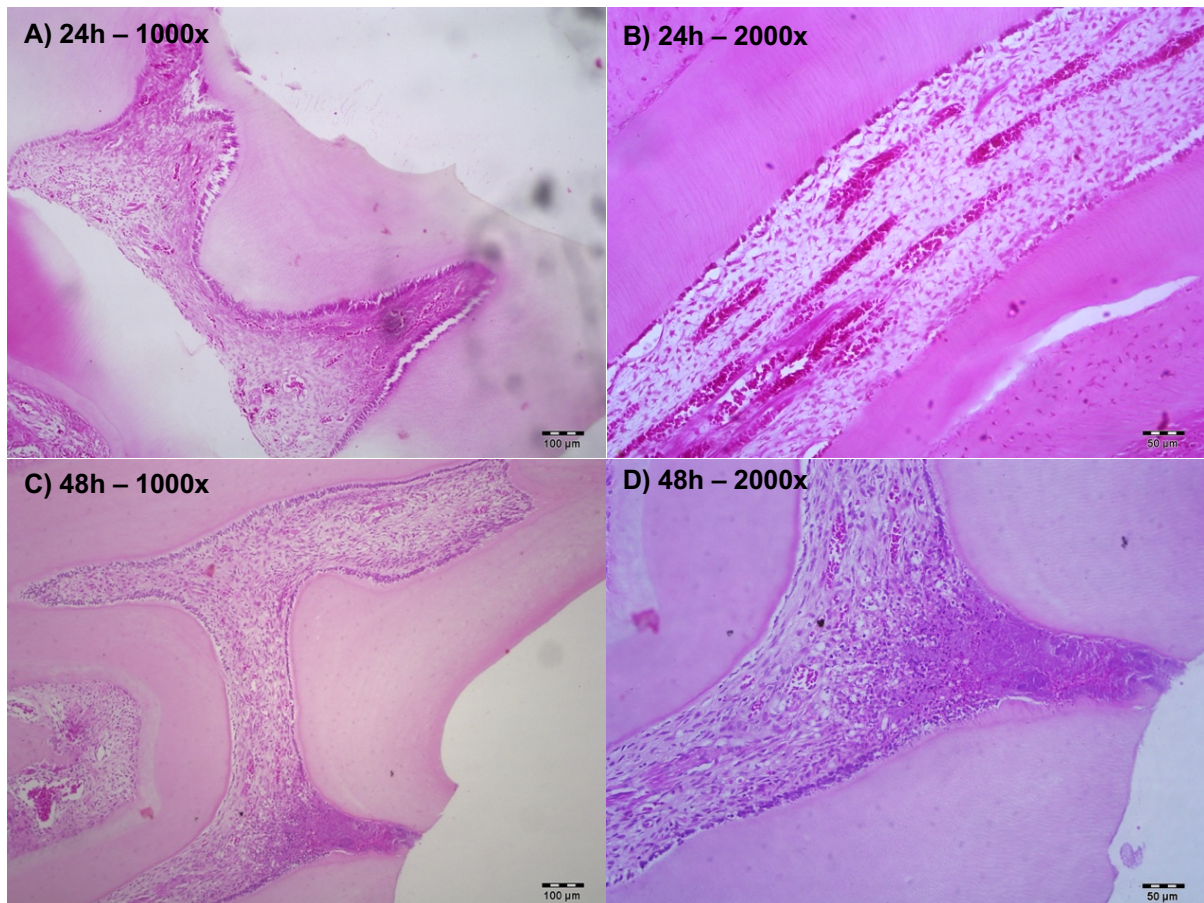
Note: * above when $p < 0.05$ compared to the same period in naïve group. Data analyzed by to-way ANOVA test followed by Bonferroni post test. * below when $p < 0.05$ compared to basal reading after pulp exposure. Data analyzed by repeated measures ANOVA test followed by Tukey post test. $n=10$ (2 teeth from 5 animals).

Histological analysis

The pulp inflammation induction model was effective, being confirmed histologically. Twenty-four hours after pulp exposure the intense inflammatory infiltrate is evidenced, showing an increase in vessel caliber and hyperemia of the tissue evidenced by congested vessels (figure 5.12a and 5.12b). After 48h the inflammatory infiltrate becomes even more evident near the pulp exposure region, the interruption

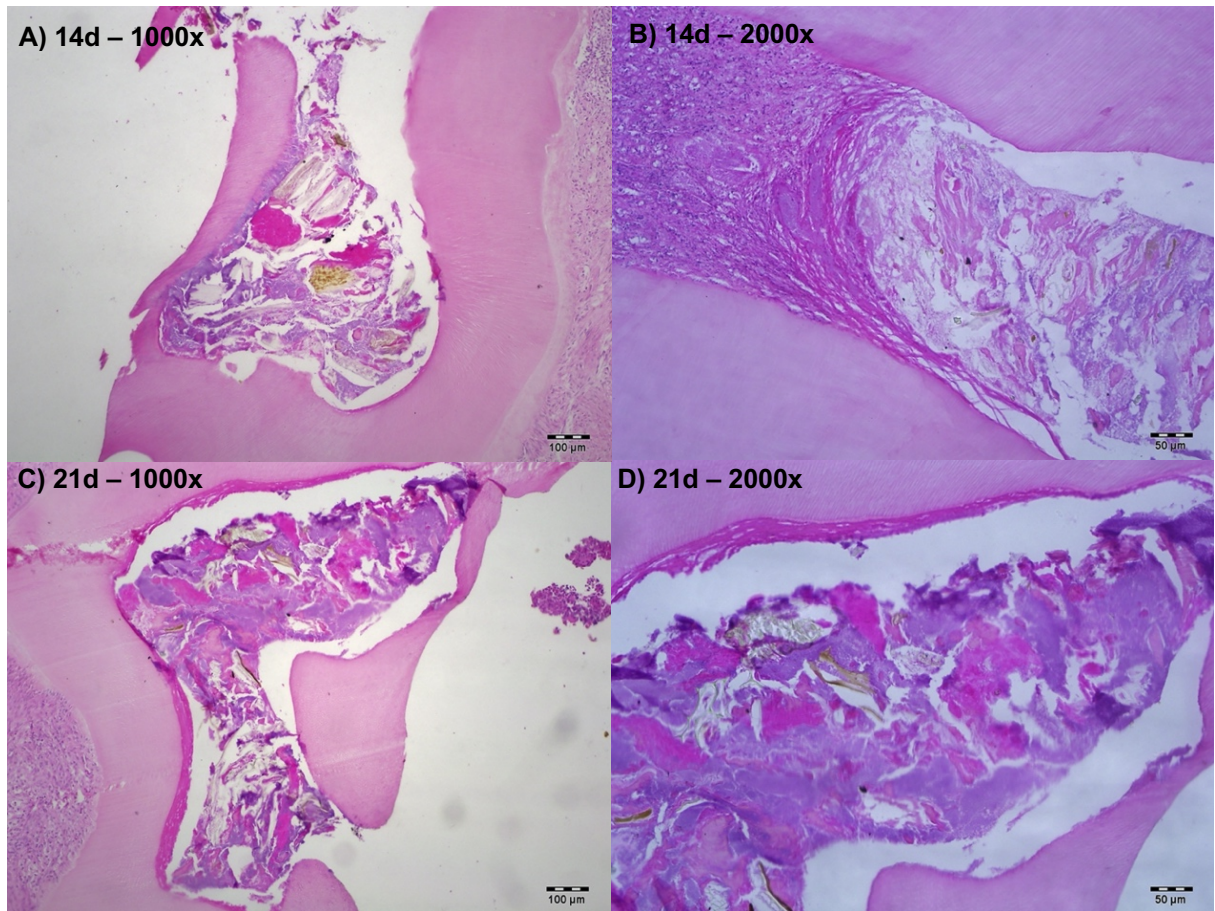
of the odontoblast layer becomes more extensive, the congested blood vessels are still visible, besides the tissue architecture changes, decreasing the cellular component near the exposed region, indicating a process of tissue necrosis (figure 5.12c and 5.12d).

Figure 5.12 - Photomicrographs of pulp inflammation model after 24h and 48h. Hematoxylin and Eosin-stained sections.



In the pulp necrosis induction model, 14 days after the pulp tissue is exposed in the oral cavity it is possible to verify the pulp chamber tissue necrosis evidenced by the loss of the cellular component and alteration of the normal tissue architecture (figure 5.13a and 5.13b). However, in the region of root pulp, an intense cellular inflammatory component is still found, without the presence of the odontoblast layer, with some foci of necrosis. After 21 days it is possible to verify the total necrosis of the pulp tissue (figure 5.13c and 5.13d).

Figure 5.13 - Photomicrographs of pulp necrosis model after 14 days and 21 days. Hematoxylin and Eosin-stained sections.

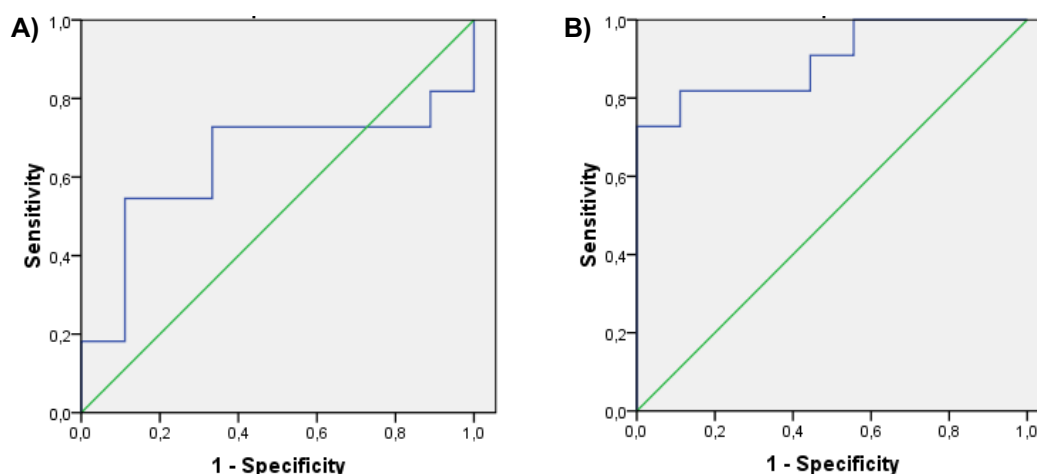


ROC curve

To analyze the discriminative power of the LDF test to diagnose the pulp condition, the ROC curve was performed and evaluated if the test had a statistical difference ($p < 0.05$) compared to the diagonal line of null hypothesis, as well as the distance from the ROC curve of the diagonal line of null hypothesis, shown by the area under the curve. Furthermore, were defined cut-off points that best discriminate the necrosis and the inflammation compared to the healthy pulp tissue.

The ROC curve is a graphical analysis of the capability of a test to discriminate a dichotomous outcome, obtained by the sensitivity and specificity coefficients of the test. Thus, two ROC curves were obtained, one to evaluate the capacity of the test to diagnose pulp inflammation (figure 5.14a) and the other for pulp necrosis (figure 5.14b). For this analysis, 2 teeth from 5 animals were considered, totaling 10 samples per group.

Figure 5.14 - ROC curve of laser-Doppler flowmetry for: a) pulp inflammation diagnosis; and b) pulp necrosis diagnosis.



The area under the curve to diagnose pulp inflammation was 0.636, with no significant difference in the diagonal of the null hypothesis ($p=0.305$). Thus, no further analyses were performed to validate the method. For the diagnosis of pulp necrosis, the area under the curve was 0.899, presenting a statistically significant difference of the diagonal of the null hypothesis ($p=0.003$). Animals with PBF values below 17.2833 were diagnosed with pulp necrosis.

Using the cut-off point established to pulp necrosis by the ROC curve, the diagnoses obtained by LDF and histopathological analysis were compared. The frequency of true and false positive and true and false negatives was tabulated in a contingency table (table 5.3). Thus, the LDF for the diagnosis of pulp necrosis presented a sensitivity rate of 100% and specificity of 90%, a positive predictive value of 0.909, a negative predictive value of 1 and an accuracy of 95%.

Table 5.3 - Frequency analysis of true/false positive/negative for pulp necrosis obtained by laser-Doppler flowmetry (LDF) compared to histopathological analysis.

Laser-Doppler Flowmetry	Histopathology (gold standard)		
	POSITIVE (necrosis)	NEGATIVE (vital)	TOTAL
POSITIVE (necrosis)	True positive 10 A	False positive 1 B	11
NEGATIVE (vital)	False negative 0 C	True negative 9 D	9
TOTAL	10	10	20
Calculations for Test Validation			
Sensitivity	1		
Specificity	0,9		
Predictive Value +	0,909		
Predictive Value -	1		
Accuracy	0,95		

Discussion

Several studies evaluating blood flow through LDF use chloral hydrate as a sedative and anesthetic agent for the lowest impact on cardiovascular parameters.³¹⁻³⁴ Other studies use the association of ketamine hydrochloride with xylazine hydrochloride, but articles indicate that this anesthetic protocol may promote changes in cardiovascular parameters, such as marked hypotension,^{35,36} bradycardia - even after recovery from anesthesia³⁶ -, and PBF values of 29 to 42% lower,³⁷ which may interfere with flowmetry measurements. Hétu et al. (2013)³⁸ recommends the use of ketamine and xylazine in experiments of short duration, which was not possible in the present work due to the need for several measurements. In addition, Moulton et al. (2017)³⁷ found that intraperitoneal application of ketamine and xylazine promotes changes in time-dependent blood flow, where mean blood pressure decreases over time and heart rate increases, making it impossible to reproduce the data in different animals. Another obstacle to the use of the association of ketamine and xylazine in this study is the suppressive effect of ketamine in the production of inflammatory mediators such as TNF- α .^{39,40}

LDF, although considered a gold standard for diagnosing the pulp condition,¹ it is a technique difficult to reproduce because of the very sensitivity to external variations in positioning and stability. The localized nature of the flow signal only permits comparisons of measurements from the single site in the same individual, but not measurements across different individuals or even different sites within the same individual. In addition, there may be interference in measurement resulting from the movement artifact, which produces changes in the flow signal that can be misinterpreted.¹⁹ Clinical studies using LDF as a method for evaluating pulp condition use silicone guides to handle the insertion of the probe into the tooth surface, trying to reproduce the same position at different times.⁴¹ However, our study demonstrated that this technique did not make the data more reproducible for gauging the PBF of the maxillary first molars of rats. The use of individual or standardized guides of rigid or flexible material did not promote results with less variability and could perform the readings by positioning the probe manually. The minimal change in the adaptation of the guide could promote deviations in the positioning of the probe, producing discrepant values, making data reproducibility impossible. Positioning the probe

directly on the occlusal surface of the tooth allowed a good stabilization, providing reproducible data both for only one examiner and for different examiners as demonstrated by the Bland-Altman concordance analysis.

The mechanical aggression and the pulp exposure to the oral environment and keeping teeth uncapped promote an inflammatory response.²⁷ During the pulp inflammatory response several mediators are released, such as serotonin (5-hydroxytryptamine 5-HT), prostaglandin E2 (PGE2), bradykinin (BK), substance P (SP), calcitonin gene-related peptide (CGRP) and histamine. These mediators, in addition to assisting in the transmission of nociception, act on the blood vessels and are responsible for altering the hemodynamics of pulp microcirculation.^{7,8} The inflammation induces vasodilation of arterioles and increased capillary permeability, causing a decrease in vascular resistance and therefore increases blood flow.⁷ Kim et al. (1992)⁸ demonstrated that moderately inflamed pulp tissue presents an increase in PBF above 40%, and partially necrosed pulp tissue presents a decrease in PBF of about 35%. Our study found similar values, in which the pulp inflammation model promoted an increase of $48\% \pm 23$ after 6 hours and $52\% \pm 28$ after 48 hours, while necrosis promoted a reduction of $44\% \pm 17$ in PBF after 21 days, at which time total pulp tissue necrosis was detected. Furthermore, histological analysis proved that the experimental pulp inflammation and necrosis models were efficient, although the pulp inflammation model through pulp exposure and sealed with cotton and restorative material has promoted different inflammation severities in the dental elements.

A long time ago clinical studies suggest that LDF can distinguish teeth with necrotic pulps from vital teeth.⁴² However, a recent study points to the inefficiency of laser-Doppler in differentiating between vital and non-vital pulp teeth in children within an acceptable level of confidence, with a high probability of false results.⁴¹ To validate the LDF method in rat molars, we used the ROC curve analysis. For the test to be considered acceptable values under the curve greater than or equal to 0.7 are desirable. Above 0.8 the test is considered excellent and above 0.9 is outstanding.⁴³ The LDF has been shown to be efficient to distinguish pulp necrosis from vital teeth in maxillary first molars of rats, with an area under the curve of 0.954 ($p \leq 0.000$), presenting good values of sensitivity, specificity, positive and negative predictive value, and accuracy. Among the 28 teeth analyzed, only 2 were diagnosed with necrosis being healthy, and 2 cases were diagnosed as healthy even with necrotic pulp tissue. The method presented a 0.857 proportion of true positive teeth in relation to those with

positive diagnosis (true positive predictive value), and 0.875 proportion of true negative subjects in relation to the negative diagnosis (true negative predictive value), resulting in a 0.857 proportion of hits (accuracy).

In our study, although LDF was able to detect an increase in PBF of around 50% in the inflamed pulp, the measurements showed a very marked variation, with a standard deviation of up to 28%. In addition, in the ROC curve analysis, the method showed a low discrimination power (inadequate performance) of the inflamed and healthy pulp tissue, demonstrated by the value of the area under the curve of 0.612, besides not being statistically different from the diagonal of null hypothesis, that suggests no discrimination. In the pulp inflammation model, small variations inherent in the pulp exposure procedure promoted varying levels of aggression to the tissue, by the mechanical action of pulp exposure or bacterial contamination due to impracticality of tooth isolation.²⁷ It is known that the degree of pulp contamination determines the intensity and extent of the inflammatory response that will occur.^{2,4,6,44} and may result in a delay in pulp healing.⁴⁵ Thus, the teeth were in different stages of inflammation, presenting characteristic vascular changes in each stage, which reflected in discrepant values of PBF, evidenced by the high value of the standard deviation. In addition, is possible to verify the coexistence of different conditions in various parts of the same pulp. Thus, no homogeneous histopathological result was found between the samples that would allow them to be classified in the same histopathological framework, which reflected in the variability of PBF values. This way it was impossible to establish a specific cut-off point that would safely characterize the pulp inflammation condition.

Conclusion

The results of the present study suggest that laser-Doppler measurements of maxillary first molars of rats can be performed without the aid of guides, positioning the probe perpendicularly on the occlusal surface of the tooth, promoting reproducible results both intra and inter-examiner. Moreover, LDF is able to differentiate vital pulp from non-vital pulp (necrosis) in the maxillary first molars of rats, presenting an area value under the ROC curve of 0.899, and can be used to analyze pulp therapy outcomes in animal models. However, the method is not sensitive and specific enough to accurately diagnose the pulp inflammation condition.

References

- 01- ALGHAITHY, R.A.; QUALTROUGH, A.J.E. Pulp sensibility and vitality tests for diagnosing pulpal health in permanent teeth: a critical review. **International Endodontic Journal**, v. 50, p. 135–142, 2017.
- 02- GOLDBERG, M.; FARGES, J.C.; LACERDA-PINHEIRO, S.; SIX, N.; JEGAT, N.; DECUP, F.; SEPTIER, D.; CARROUEL, F.; DURAND, S.; CHAUSSAIN-MILLER, C.; DENBESTEN, P.; VEIS, A.; POLIARD, A. Inflammatory and immunological aspects of dental pulp repair. **Pharmacological Research**, v. 58, n. 2, p. 137–147, 2008.
- 03- CAVALCANTI, B.N.; RODE, S.M.; FRANÇA, C.M.; MARQUES, M.M. Pulp capping materials exert an effect on the secretion of IL-1 β and IL-8 by migrating human neutrophils. **Brazilian Oral Research**, v. 25, n. 1, p.13-8, 2011.
- 04- COOPER, P.R.; TAKAHASHI, Y.; GRAHAM, L.W., et al. Inflammation-regeneration interplay in the dentine-pulp complex. **Journal of Dentistry**, v. 38, n. 9, p. 687–97, 2010.
- 05- GOPIKRISHNA, V.; PRADEEP, G.; VENKATESHBABU, N. Assessment of pulp vitality: a review. **International Journal of Paediatric Dentistry**, v. 109, n. 1, p. 3-15, 2009.
- 06- HILTON, T.J. Keys to clinical success with pulp capping: a review of the literatura. **Operative Dentistry**, v. 34, n. 5, p. 615-625, 2009.
- 07- TONDER, K. J. H. Vascular Reactions in the Dental Pulp During Inflammation. **Acta Odontologica Scandinavica**, v. 41, n. 4, p. 247–56, 1983.
- 08- KIM, S.; LIU, M.; SIMCHON, S.; DORSCHER-KIM, J.E. Effects of selected inflammatory mediators on blood flow and vascular permeability in the dental pulp. **Proceedings of the Finnish Dental Society**, v. 88, n. 1, p. 387-92,1992.
- 09- KARAYILMAZ, H.; KIRZIOGLU, Z. Evaluation of pulpal blood flow changes in primary molars with physiological root resorption by laser Doppler flowmetry and pulse oximetry. **The Journal of Clinical Pediatric Dentistry**, v. 36, n. 2, p. 139-44, 2011.
- 10- SABUNCUOGLU, F.A.; ERSAHAN, S. Changes in maxillary molar pulp blood flow during orthodontic intrusion. **Australian Orthodontic Journal**, v. 30, n. 2, p. 152-60, nov. 2014.
- 11- SABUNCUOGLU, F.A.; ERSAHAN, S. Comparative evaluation of pulpal blood flow during incisor intrusion. **Australian Orthodontic Journal**, v. 31, n. 2, p. 171-7, nov. 2015.
- 12- ROEYKENS, H.J.; DESCHEPPER, E.; DE MOOR, R.J. Laser Doppler flowmetry: reproducibility, reliability, and diurnal blood flow variations. **Lasers in Medical Science**, v. 31, n. 6, p. 1083-92, ago. 2016.

- 13- FIGUEIRAS, E.M.A. Métodos e instrumentação para fluxometria laser: aplicações à microcirculação sanguínea. 2001. 215 f. Tese (Doutorado em Física Tecnológica) – **Universidade de Coimbra**, Coimbra. 2012.
- 14- SILVEIRA, D.L.; VALE, M.S. Laser Doppler em Endodontia: revisão da literatura. **Journal of the Health Sciences Institute**, v. 30, n. 2, p. 120-4, 2012.
- 15- NOGUEIRA, G. E. C.; ZECELL, D. M.; EDUARDO, L. R. P.; VIEIRA JR., N. D.; BALDOCHI, S. L.; ROSSI, W. Desenvolvimento de um Sensor de Fluxo Sangüíneo via Técnica Laser Doppler. In: **XVII Encontro Nacional de Física da Matéria Condensada**, Florianópolis, p. 1-3, 2000.
- 16- MORAES, M.P. Fluxometria Laser Doppler da polpa dental após clareamento com laser de diodo. São Paulo, 2006. 47 f. Dissertação (Mestrado em Lasers em Odontologia). **Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares**. Autarquia Associada à Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.
- 17- ENKEMA, L.; HOLLOWAY, G.A.; PIRAINO, D.W.; HARRY, D.; ZICK, G.L.; KENNY, M.A. Laser doppler velocimetry vs heater power as indicators of skin perfusion during transcutaneous O₂ monitoring. **Clinical Chemistry**, v. 27, n. 3, p. 391-396, 1981.
- 18- BONNER, R.F.; NOSSAL, R. Modal for laser doppler measurements of blood flow in tissue. **Applied Optics**, v. 20, p. 2097-2107, 1981.
- 19- OBEID, A.N.; DOUGHERTY, G.; PETTINGER, S. In vivo comparison of a twin wavelength laser doppler flowmeter using he-ne and laser diode sources. **Journal of Medical Engineering and Technology**, v. 14, n. 3, p. 102-110, 1990.
- 20- KIM S. Regulation of pulpal blood flow. **Journal of Dental Research**. v. 64, p. 590-6, 1985.
- 21- OLGART, L.; KOSTOUROS, G.D.; EDWALL, L. Local actions of acetylcholine on vasomotor regulation in rat incisor pulp. **Acta Physiologica Scandinavica**, v.158, n. 4, p. 311-16, 1996.
- 22- YANPISET, K.; VONGSAVAN, N.; SIGURDSSON, A.; TROPE, M. The efficacy of Laser Doppler Flowmetry for the diagnosis of revascularization of reimplanted immature dog teeth. **Dental Traumatology**, v. 17, n. 2, p. 63-70, 2001.
- 23- YU, C.Y.; BOYD, N.M.; CRINGLE, S.J.; SU, E.N.; ALDER, V.A.; YU, D.Y. An in vivo and in vitro comparision of the effects of vasoactive mediators on pulpal blood vessels in rat incisors. **Archives of Oral Biology**, v. 47, n. 10, p. 723–732, 2002.
- 24- ZERARI-MAILLY, F.; BRAUD, A.; DAVIDO, N.; TOURÉ, B.; AZÉRAD, J.; BOUCHER, Y. Glutamate controlo f pulpal blood flow in the incisor dental pulp of the rat. **European Journal of Oral Science**, v. 120, n. 5, p. 402–407, 2012.
- 25- GOLDBERG, M.; KELLERMAN, O.; DIMITROVA-NAKOV, S.; HARICHANE, Y.; BAUDRY, A. Comparative studies between mice molars and incisors are required to draw an overview of enamel structural complexity. **Frontiers in Physiology, Craniofacial biology**, v. 5, article 359, p. 1-6, 2014.

- 26- WARSHAWSKY, H.; JOSEPHSEN, K.; THYLSTRUP, A.; FEJERSKOV, O. The development of enamel structure in rat incisors as compared to the teeth of monkey and man. **The Anatomical Record**, v. 200, n. 4, p. 371-399, 1981.
- 27- TRONGKIJ, P.; SUTIMUNTANAKUL, S.; LAPTHANASUPKUL, P.; CHAIMANAKARN, C.; WONG, R.; BANOMYONG, D. Effects of the exposure site on histological pulpal responses after direct capping with 2 calcium-silicate based cements in a rat model. **Restorative Dentistry & Endodontics**, v. 43, n. 4, p. e36, 2018.
- 28- SABIR, A.; TABBU, C.R.; AUGUSTIONO, P.; SOSROSENO, W. Histological analysis of rat dental pulp tissue capped with própolis. **Journal of Oral Science**, v. 47, n 3, p 135-38, 2005.
- 29- KIRK, E.E.J.; LIM, K.C.; KHAN, M.O.G. A comparison of dentinogenesis on pulp capping with calcium hydroxide in paste and cement form. **Oral Surgery, Oral Medicine, and Oral Pathology**, v. 68, n. 2, p. 210-19, 1989.
- 30- CUPERTINO, R.R.; FABRI, F.V.; CELTRINI, V.C.; HIDALGO, M.; BRUSCHI, M.L.; OLIVEIRA, M.M.W. Histological evaluation of the rat dental pulp after indirect capping with sildenafil or L-NAME incorporated into a bioadhesive thermoresponsive system. **Acta Scientiarum. Health Sciences**. Maringá, v. 38, n. 1, p. 95-101, 2016.
- 31- ULRICH, P.T.; KROPPESTEDT, S.; HEIMANN, A.; KEMPSKI, O. Laser-Doppler Scanning of local cerebral blood flow and reserve capacity and testing of motor and memory functions in a chronic 2-vessel occlusion model in rats. **Stroke**, v. 29, n. 11, p. 2412-2420, 1998.
- 32- URANISHI, R.; NAKASE, H.; SAKAKI, T.; KEMPSKI, O.S. Evaluation of absolute cerebral blood flow by Laser-Doppler Scanning – Comparison with Hydrogen Clearance. **Journal of Vascular Research**, v.36, n. 2, p. 100-105, 1999.
- 33- SOEHLE, M.; HEIMANN, A.; KEMPSKI, O. Laser Doppler Scanning: How many measurements are required to assess regional cerebral blood flow? **Acta Neurochirurgica [Suppl]**, v. 76, p. 181-184, 2000.
- 34- LIU, L.F.; YEH, C.K.; CHEN, C.H.; WONG, T.W.; CHEN, J.J.J. Measurement of cerebral blood flow and oxygen saturation using laser doppler flowmetry and near infrared spectroscopy in ischemic stroke rats. **Journal of Medical and Biological Engineering**, v. 28, n. 2, p.101-105, 2008.
- 35- GARGIULO, S.; GRAMANZINI, M.; LIUZZI, R.; GRECO, A.; BRUNETTI, A.; VESCE, G. Effects of some anesthetic agents on skin microcirculation evaluated by laser Doppler perfusion imaging in mice. **BMC Veterinary Research**, v. 9, p. 255-261, 2013.
- 36- PICCOLO, C.; SERRA, A.J.; LEVY, R.F.; ANTONIO, E.L.; DOS SANTOS, L.; TUCCI, P.J.F. Hemodynamic and thermoregulatory effects of xylazine-ketamine mixture persist even after the anesthetic stage in rats. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 64, n. 4, p.860-4, 2012.

- 37- MOULT, E.M.; CHOI, W.J.; BOAS, D.A.; BAUMANN, B.; CLERMONT, A.C.; FEENER, E.P.; FUJIMOTO, J.G. Evaluating anesthetic protocols for functional blood flow imaging in the rat eye. **Journal of Biomedical Optics**, v. 22, n. 1, p. 16005, 2017.
- 38- HÉTU, S.; POULIOT, M.; CORDAHI, G.; COUTURE, R.; VAUCHER, E. Assessment of retinal and choroidal blood flow changes using laser doppler flowmetry in rats. **Current eye research**, v. 38, n. 1, p. 158-167, 2013.
- 39- TAKENAKA, I.; OGATA, M.; KOGA, K.; MATSUMOTO, T.; SHIGEMATSU, A. Ketamine supresse endotoxin-induced tumor necrosis factor alpha production in mice. **Anesthesiology**, v. 80, n. 2, p. 402-8, 1994.
- 40- UNAL, G.; TERZIOGLU, G.; SAHIN, C.; DEMIREL, G.Y.; ARICIOGLU, F. Acute administration of ketamine inhibited stress induced pro-inflammatory cytokines in hippocampus of rats. **Bulletin of Clinical Psychopharmacology**, v. 25, suppl. 1, n. S101, 2015.
- 41- GOUTH, N.; DUGGAL, M.S.; KANG, J.; NAZZAL, H. A Diagnostic Accuracy Study of Laser Doppler Flowmetry for the Assessment of Pulpal Status in Children's Permanent Incisor Teeth. **Journal of Endodontics**, v. 45, n. 5, p. 543-8, 2019.
- 42- INGÓLFSSON, A.R.; TRONSTAD, L.; HERSH, E.V.; RIVA, C.E. Efficacy of laser Doppler flowmetry in determining pulp vitality of human teeth. **Endodontics & Dental Traumatology**, v. 10, n. 2, p. 83-7, 1994.
- 43- MANDREKAR, J.N. Receiver Operating Characteristic Curve in diagnostic test assessment. **Biostatistics for Clinicians**. Vol 5, issue 9, 1315-1316, 2010.
- 44- GOLDBERG, M.; NJEH, A.; UZUNOGLU, E. Is pulp inflammation a prerequisite for pulp healing and regeneration? **Mediators of Inflammation**. v. 2015, Article ID 347649, 11 pages, 2015.
- 45- COTTON, W.R. Bacterial contamination as a factor in healing of pulp exposures. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, v. 38, p. 441-50, 1974.

5.3 ARTIGO 3: EFFECT OF TOPICAL APPLICATION OF ASCORBIC ACID-COATED GOLD NANOPARTICLES IN RAT TEETH SUBMITEED TO PULP EXPOSURE

SANSON, M.A.S.^{1,3}; OTUKI, M.F.²; SANTOS, F.A.³

¹ PhD student of Odontology - State University of Ponta Grossa

² Professor of Department of Pharmacology - Federal University of Paraná

³ Professor of Department of Odontology - State University of Ponta Grossa

Abstract

Introduction: Several clinical situations promote the exposure of pulp tissue, and the application of a protective material that seals the exposure and promotes dentinogenesis and pulp repair is essential for maintaining the vitality of the dental element. Gold nanoparticles (AuNPs) due to their antioxidant, antimicrobial and anti-inflammatory effects can be a promising material for this purpose. **Objective:** To investigate the effect of AuNPs on pulp repair after experimental exposure. **Material and Methods:** Pulp exposure was performed on the first maxillary molars of 18 female Wistar rats, divided into 3 groups, which received pulp capping with sterile cotton (sham group), calcium hydroxide PA (gold standard) and AuNPs (experimental group) and restored with composite resin, being followed for up to 7, 14 and 21 days. Pulpal blood flow (PBF) measurements were performed using baseline laser-Doppler flowmetry, immediately, 3 days, 5 days, 7 days, 14 days and 21 days after pulp capping. In the histological analysis, each tooth received scores for dentin bridge formation, tissue integrity, and severity of inflammation. **Results:** Immediately after pulp exposure, the readings showed a drop in PBF of 38%, 37% and 64% in the cotton, CaOH and AuNPs groups respectively, which reestablished themselves to values close to the baseline. After 21 days, only the CaOH-capped group showed a 29% reduction in PBF. In the group capped with AuNPs, 62.5% had a beginning of the formation of a dentin tip, 62.5% presented disorganization in the odontoblast layer and 87.5% had a moderate inflammatory infiltrate. **Conclusions:** AuNPs did not perform satisfactorily in the formation of restorative dentin when used as pulp capping material and were not superior to calcium hydroxide in modulating the intensity of the inflammatory response. In order to investigate and optimize the anti-inflammatory properties of AuNPs in direct pulp capping, nanoparticles can be associated with other components with antimicrobial effect and that stimulate the deposition of reparative dentin.

Keywords: direct pulp capping; metal nanoparticles; gold colloid; laser-Doppler flowmetry.

Introduction

Pulp tissue exposure caused by trauma, drills during cavity preparation or deep carious lesions trigger immune and inflammatory responses in the tissue,¹ which if left unchecked can develop into acute and irreversible tissue inflammation and even necrosis.^{1,2} Pulp capping treatment consists of placing a protective material directly over the pulp tissue, or lining material in deep lesions with imminent risk of pulp exposure,³ with the aim of maintaining the vitality of adjacent pulp tissue and stimulate deposition of a mineralized tissue barrier.⁴⁻⁶

The initial inflammatory response after pulp tissue injury is crucial for the recruitment and differentiation of undifferentiated cells and the consequent production

of a barrier of mineralized tissue and pulp.^{1,11} However, the control of the intensity and duration of the inflammatory response in the dental pulp is a critical factor to ensure the success of conservative therapies with direct pulp capping.³ Thus, the use of drugs that have the capacity to modulate the inflammatory response can greatly contribute to the development of new materials for pulp capping. In addition, using the pulp inflammation model to test the anti-inflammatory properties of new compounds becomes interesting due to the particular sensitivity of this tissue to the intense inflammatory process, which may lead to a rapid outcome of tissue necrosis.¹²

For many years calcium hydroxide-based cements have been regarded as the gold standard for direct pulp capping.^{3,7,8} However, it is known the limitations of this material regarding the adhesiveness to dental structures and high solubility, promotes a superficial necrosis of the tissues due to its alkaline pH, besides promoting the formation of a permeable mineralized tissue barrier, and may present tunnel defects, allowing for pulp tissue recontamination, promoting irreversible chronic inflammation.^{9,10} Despite the wide variety of materials suggested for pulp capping, the evidence is still lacking on the most appropriate material.¹³ Thus, constantly new materials are tested in order to develop a product capable of promoting more predictable and stable long-term results.

Gold nanoparticles have been an important target of research due to their diverse biological applications.¹⁴ Gold is a known biocompatible material¹³ and its nanoparticulated form may bring benefits such as its inhibitory effect on matrix metalloproteinases (MMPs)¹⁵ and its anti-inflammatory effect evidenced by the modulation of the production of inflammatory mediators.¹⁶⁻¹⁹ Results of a study conducted by Sumbayev et al. (2013)¹⁸ indicate that the anti-inflammatory activity of AuNPs is associated with their ability to interact extracellularly with IL-1 β , where IL-1 β molecules aggregate around the AuNPs, decreasing their cellular interaction. In addition, treatments with AuNPs can increase the elimination of superoxide radicals by about 60%.¹⁷ A study that used treatment with AuNPs combined with phonophoresis suggests that the treatment has an antioxidant effect and consequently decreased levels of pro-inflammatory cytokines and probably making the acute phase of inflammation shorter.¹⁹

The AuNPs synthesized according to the method of Turkevich et al. (1951)²⁰ use a metallic precursor of gold associated with a reducing agent, which is usually sodium citrate. However, other compounds with reduction potential may be used, such

as ascorbic acid.²¹ Ascorbic acid is an important antioxidant, besides being used in in vitro mineralization inducing media.²² Thus, the AuNPs synthesized with the use of ascorbic acid can have their anti-inflammatory and antioxidant properties optimized, and probably can contribute to the differentiation of cells producing a mineralized matrix, when used in conjunction with a phosphate source.²² Previous studies carried out by our group confirm that ascorbic acid-coated AuNPs also have an in vitro anti-inflammatory effect (data not shown).

Even though AuNPs cannot be used alone as direct pulp capping material, the inflammation model produced by pulp exposure is interesting to assess its in vivo anti-inflammatory effect due to the important role of modulating the intensity of the inflammatory response to promote the success of tissue repair. Thus, this study aims to evaluate the topical anti-inflammatory activity of ascorbic acid-coated AuNPs in pulp exposure of maxillary first molars of rats, histologically checking the quality of tissue repair through the production of a barrier of mineralized matrix, the pulp tissue integrity, and the inflammatory response.

Material and Methods

Synthesis of ascorbic acid-coated gold nanoparticles (AuNPs)

AuNPs were synthesized by the method of chemical reduction of the metal precursor by a reducing agent according to the technique described by Turkevich et al. (1951)²⁰ with some modifications, using ascorbic acid as a reducing agent rather than the classically used sodium citrate.²¹ A solution of tetrachlorouric acid (1 mM - Sigma – Aldrich®, Missouri, USA) was heated to 90 ° C and kept under constant stirring. Ascorbic acid (0.48 mg/ml) was added and the system was stirred until it reached the reddish color characteristic of the colloidal gold dispersion. The synthesis process was realized by the Group of Photothermal Phenomena and Complex Fluids of Physics' Department of the State University of Ponta Grossa. At the end of the synthesis process, the colloidal dispersion of AuNPs acquires the final concentration of 4 mg/ml.

Experimental design

Sixteen female Wistar rats (*Rattus norvegicus*, *Albinus wistar*) between 2 and 3 months weighing 200-250g were used. The animals were kept in a climate environment at 22°C in a 12h light-dark cycle, with free access to a balanced diet and water. The study was approved by the local Ethics Committee in Animal Research under protocol nº 045/2017, and the experiments were performed according to the ethical principles of COBEA (Brazilian College of Animal Experimentation). Preferred use of females was due to the laser-Doppler flowmetry (LDF) method being standardized on female animals in previous studies from our group.

The animals were divided into 3 groups (n = 4 per group).

- Sham - Pulp exposure and sterile cotton capping. Restoration with composite resin. Pulpal blood flow (PBF) readings throughout the experimental period (4 animals for analysis of 21 days).
- Calcium hydroxide (CaOH) - Pulp exposure and capping with calcium hydroxide (gold standard). Restoration with composite resin. PBF readings throughout the experimental period (4 animals for analysis of 21 days).
- AuNPs - Pulp exposure and sterile cotton capping with AuNPs (experimental group). Restoration with composite resin. PBF readings throughout the experimental period (4 animals for analysis of 21 days).

Four animals were used for a brief descriptive histopathological analysis after 7 and 14 days of treatment in the AuNPs and CaOH groups, which were not considered in the statistical analyzes.

Pulp exposure and pulp capping

Initially, the animals were sedated with 4% chloral hydrate solution at a dose of 400 mg/kg and placed on a surgical table that allowed the animals to open their mouth and access the upper molars. With the aid of a sterile 1012 diamond rotating spherical drill, a 1 mm deep cavity was made in the occlusal surface of the right and left upper first molars, approaching the maximum pulp tissue leaving only a thin layer of dentin. Subsequently, the dentinal wall was punctured with a sterile hypodermic needle exposing the pulp tissue. Hemostasis was performed with sterile cotton and physiological solution. Then the animals received the treatment determined according

to their respective group. The animals of the Sham group received only a sterile cotton fragment on the pulp exposure and the cavity was sealed with self-etching dentin adhesive (Ambar APS FGM® - light-cured for 20 seconds) and composite resin (light-cured for 40 seconds). In the animals of the CaOH group, a P.A. calcium hydroxide paste prepared with a sterile saline solution was applied over the exposure region and isolated with a small sterile cotton fragment. The cavity was filled in the same manner described above. The experimental group received a sterile cotton fragment immersed in 10 µl of AuNPs (4 mg/ml). Following the cavity was also filled as already described. In the end, the antagonist tooth was slightly worn to avoid occlusal overload of the operated tooth, avoiding the fall of the restoration and allowing tissue repair. The pulp exposure and pulp capping were performed according to TRONGKIJ, et al. (2018)²³ with minor modifications.

Laser-Doppler flowmetry of maxillary first molars

The PBF measurements were performed using a MoorVMS-LDF1 semiconductor diode LDF monitor, which uses a wavelength of 785nm ± 10nm, with divergent beam light emission from the probe. optics, 0.5 to 1.2 mW aperture, 26-degree angular dispersion with 0.22 numerical aperture of 200-micron silica fiberglass. The PBF of the maxillary first molars was measured by the LDF technique, positioning the probe on the occlusal surface of the tooth, as previously validated.

The laser-Doppler probe was placed perpendicular to the tooth directly over the occlusal face of the first molar and a basal reading was performed before pulp exposure and reading immediately after pulp exposure. Following further readings were performed 3, 5, 7, 14 and 21 days after pulp exposure. Only one operator performed all measurements using a single probe, which was calibrated according to the equipment guidelines. For each measurement moment, 3 1-minute records were made, and the average of each record was analyzed and 10-second sections that remained stable at the beginning, middle and end of the reading. At the end, the average PBF value of each session was calculated.

Animal euthanasia and histological procedure

After the experimental period, the animals were euthanized by cervical dislocation under sedation with 4% chloral hydrate at a dose of 400 mg/kg intraperitoneally. The maxillas were removed and separated in hemimaxillas (totaling 8 samples of 21 days, 2 samples of 14 days and 2 samples of 7 days per group). The samples were kept in a 10% formalin solution for 48 hours and decalcified in 9% EDTA solution for 4 weeks. The samples were processed and included in paraffin with the buccal surface parallel to the cutting plane and serial sections of 6 μ m in the mesiodistal direction were performed and Hematoxylin and Eosin (H&E) stained. Three sections per sample were analyzed.

Histological analysis

The histological analysis considered the intensity of inflammation, type of inflammatory infiltrate, organization of the odontoblasts layer, dentin bridge formation, and presence of necrotic tissue.²⁴⁻²⁶

Each cut was analyzed according to Popovic-Bajic et al. (2013)²⁶, receiving scores for each parameter following the criteria below:

a) Dentin bridge formation:

- 0- no dentin bridge;
- 1- presence of incomplete dentin bridge in the pulp exposure area;
- 2- presence of dentin bridge in the lateral surface of pulp exposure; and
- 3- presence of complete dentin bridge covering the entire pulp exposure area.

b) Morphological integrity of the odontoblasts and pulp tissue:

- 0- normal pulp tissue;
- 1- disorganization of the odontoblast layer, proliferation, and hyperactivity;
- 2- complete disorganization of the pulp tissue; and
- 3- Pulpal necrosis.

c) Severity of the inflammatory response

- 0- none. Absence or very few inflammatory cells;
- 1- slight inflammation - inflammatory cells below the region of the capping material;
- 2- moderate inflammation - more than one-third of the pulp tissue with inflammatory cell infiltration; and

3- severe inflammation - diffusely infiltrated pulp with mononuclear cells, with the destruction of the normal histological organization of the pulp tissue.

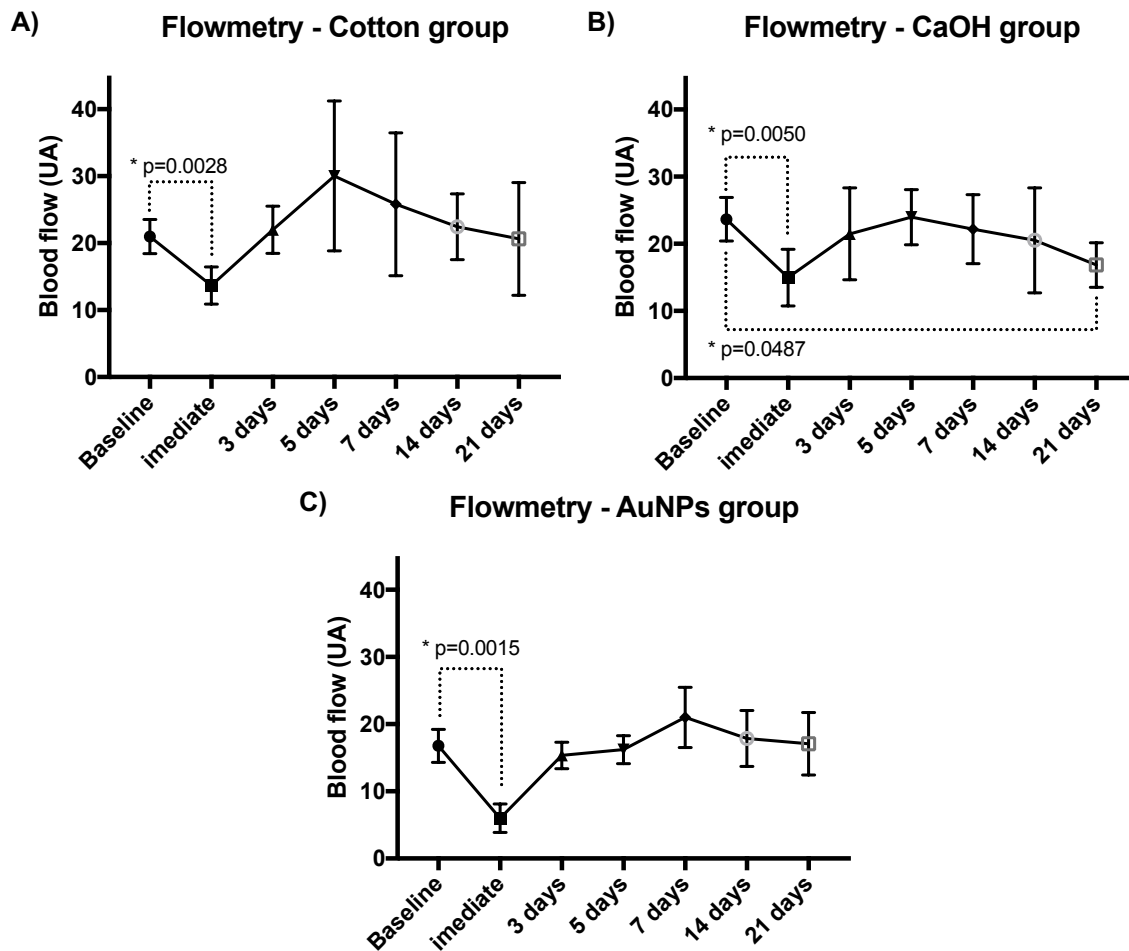
Statistical analysis

Quantitative variables (Laser-Doppler flowmetry) were analyzed using One-Way Analysis of Variance (ANOVA), and Tukey's post-test was applied when a significant difference was found between the groups, always after verifying the normality of the data with the Shapiro-Wilk test. The histopathological analysis scores were analyzed by Kruskal-Wallis test and Dunn's multiple comparisons test. The tests were performed using GraphPad Prism 7.0 statistical software.

Results

Immediately after pulp exposure, measurements of LDF showed a decrease in PBF of 38%, 37% and 64% in the cotton, CaOH and AuNPs groups respectively (figure 5.15). After 3 days, PBF was reestablished, reaching values statistically equal to baseline values in all groups. In the groups that received pulp capping with cotton and with AuNPs, there were no statistically significant changes during the experimental time. However, in the group treated with CaOH, there was a significant decrease in PBF after 21 days of pulp capping, with a reduction of 28.8%. LDF did not detect any teeth with total necrosis of the pulp tissue.

Figure 5.15 - Pulpal blood flow (PBF) values over the experimental period in groups: a) cotton; b) calcium hydroxide (CaOH); and c) ascorbic acid-coated gold nanoparticles (AuNPs).

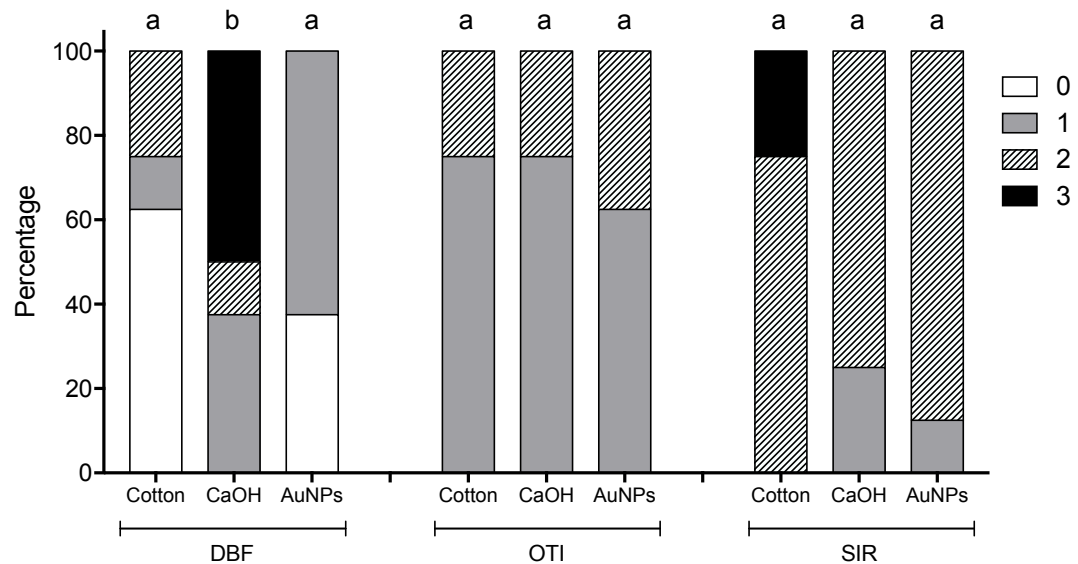


Note: *when $p < 0.05$ compared to baseline reading before pulp exposure ($n=8$). Data analyzed by repeated measures ANOVA test followed by Tukey post test.

Figure 5.16 shows the distribution and frequency of scores between groups observed by histopathological analysis after 21 days. Most of the teeth capped with cotton showed no repairing dentin bridge formation (62.5%), interruption and disorganization in the odontoblast layer (75%) and presented moderate inflammation with the inflammatory infiltrate spreading over more than one-third of the volume of the tooth pulp tissue (75%). All teeth capped with CaOH showed some degree of dentin formation, being complete in 50% of the samples, showing disorganization in the odontoblast layer (75%) and moderate inflammatory infiltrate (75%). Among the teeth capped with AuNPs, most of them started to form a dentin bridge (62.5%), while the rest showed no formation of restorative dentin, 62.5% of the samples showed disorganization in the odontoblast layer and 87.5% showed a moderate inflammatory infiltrate. DBF was the only parameter that showed a statistical difference between the

groups, in which CaOH showed higher scores of induction of reparative dentin formation compared to other materials.

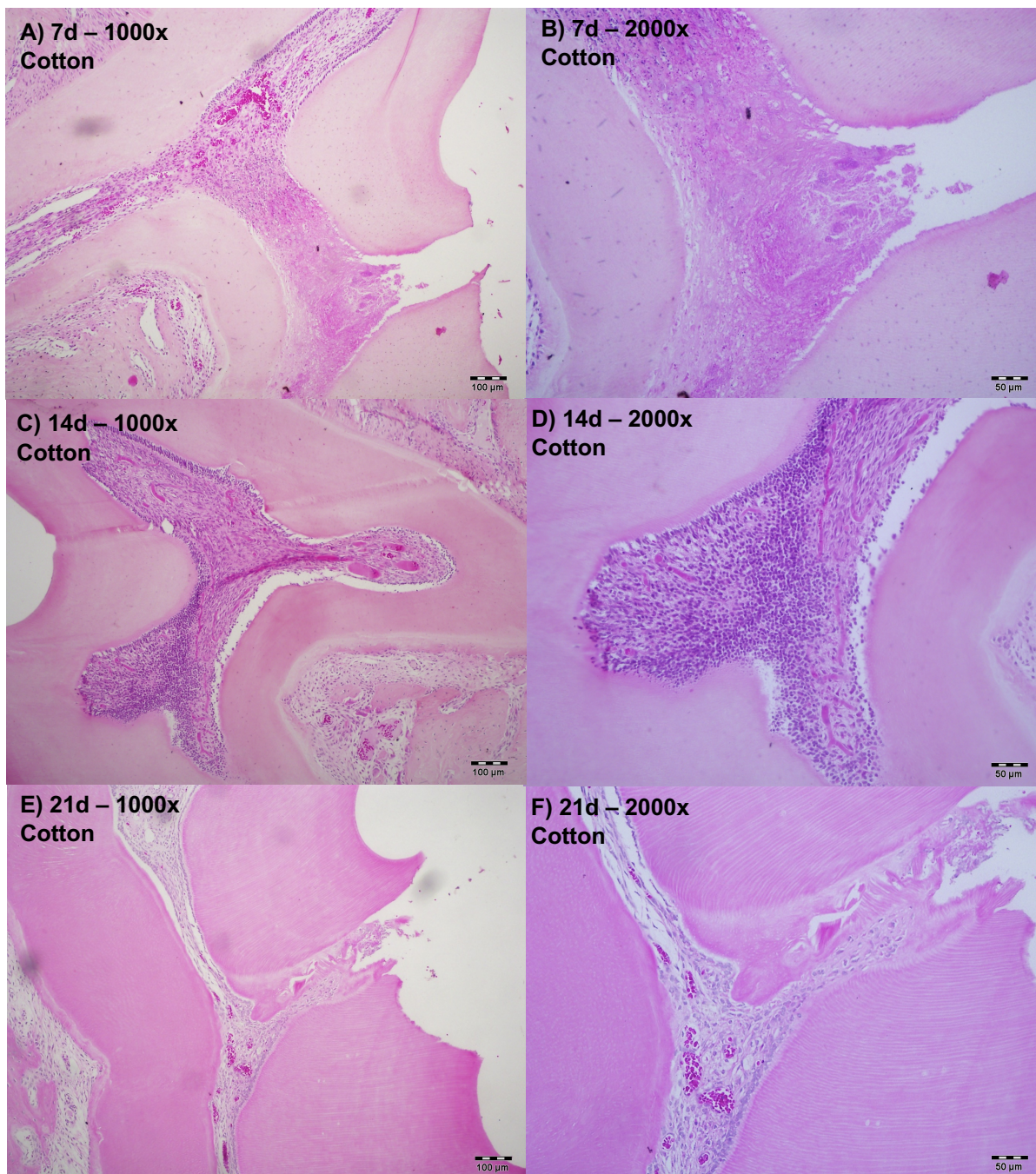
Figure 5.16 - Frequency distribution of histopathological analysis scores after pulp capping with different materials.



Note: DBF: Dentin bridge formation. OTI: Odontoblasts and tissue integrity. SIR: Severity of the inflammatory response. The scores were analyzed by Kruskal-Wallis test: DBF ($p=0.008$), OTI ($p=0.824$) and SIR ($p=0.083$). Different letters indicate statistical difference in Dunn's multiple comparisons test. We found significant differences in DBF scores between CaOH and Cotton ($p=0.010$), and between CaOH and AuNPs ($p=0.007$).

After the direct pulp capping with cotton, the histological analysis showed no dentin bridge formation after 7 and 14 days, blood vessels congested and the presence of a severe inflammatory infiltrate with the destruction of the normal histological organization of the pulp tissue and the odontoblasts layer. After 21 days some samples showed the onset of formation of a repair dentin bridge, but the blood vessels remained congested and with a significant inflammatory infiltrate and alteration of the odontoblast layer (figure 5.17).

Figure 5.17 - Photomicrographs of pulp tissue response to direct pulp capping with sterile cotton in sham group, after: a) 7 days; b) 14 days; and c) 21 days.

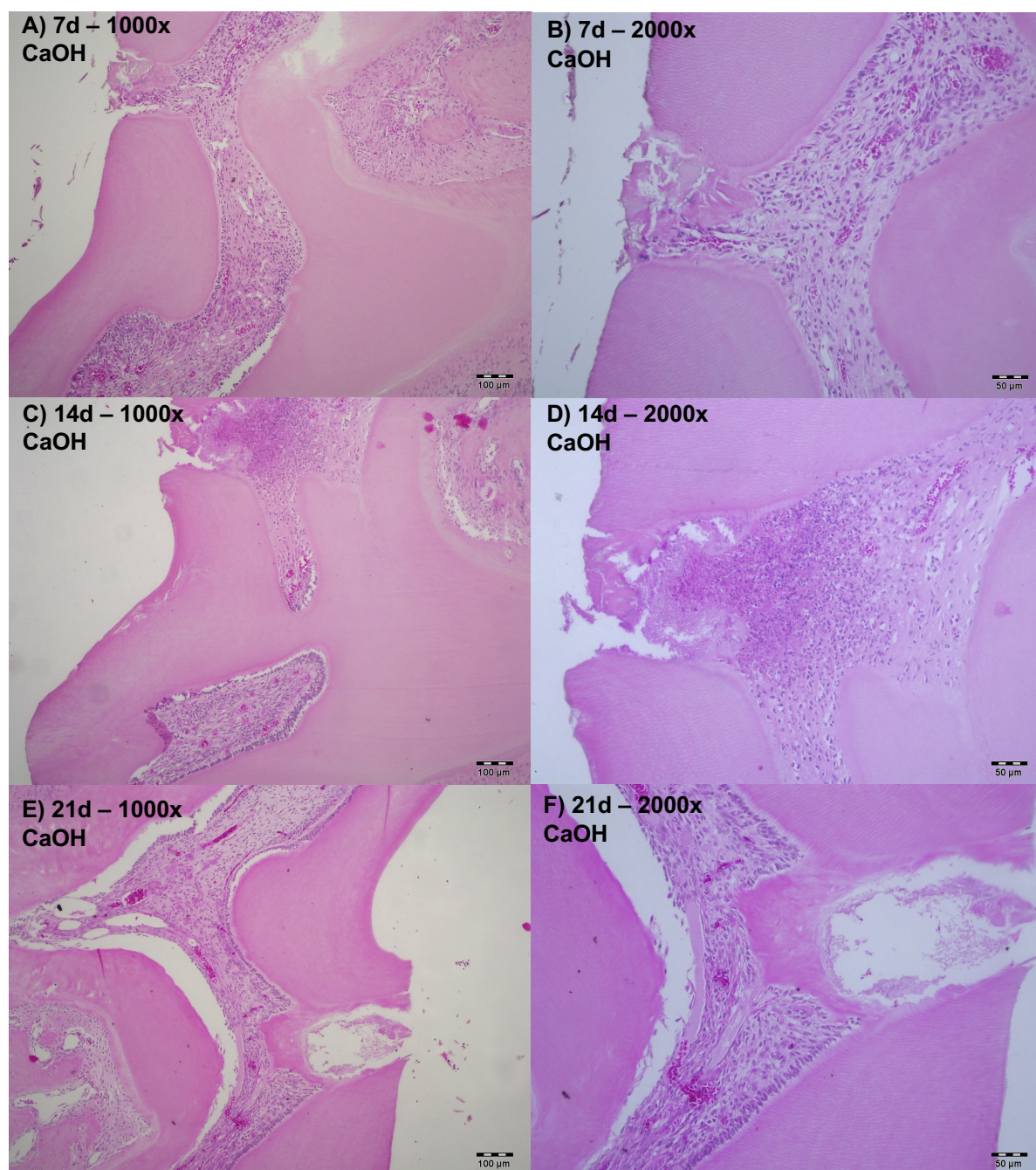


Note: H&E-stained sections showed the dentin bridge formation process.

The group that received CaOH as capping material showed in 7 days remains of dentin fragments, presence of a moderate inflammatory infiltrate, congested blood vessels and alteration of the odontoblast layer near the exposed region. After 14 days the inflammatory infiltrate intensifies near the attacked pulp region, showing a layer of necrosed tissue and the onset of dentin bridge formation. In 21 days it is possible to

verify the reorganization of the pulp tissue, with the presence of a complete repair dentin bridge, congested vessels and the presence of a diffuse inflammatory infiltrate in the tissue (figure 5.18).

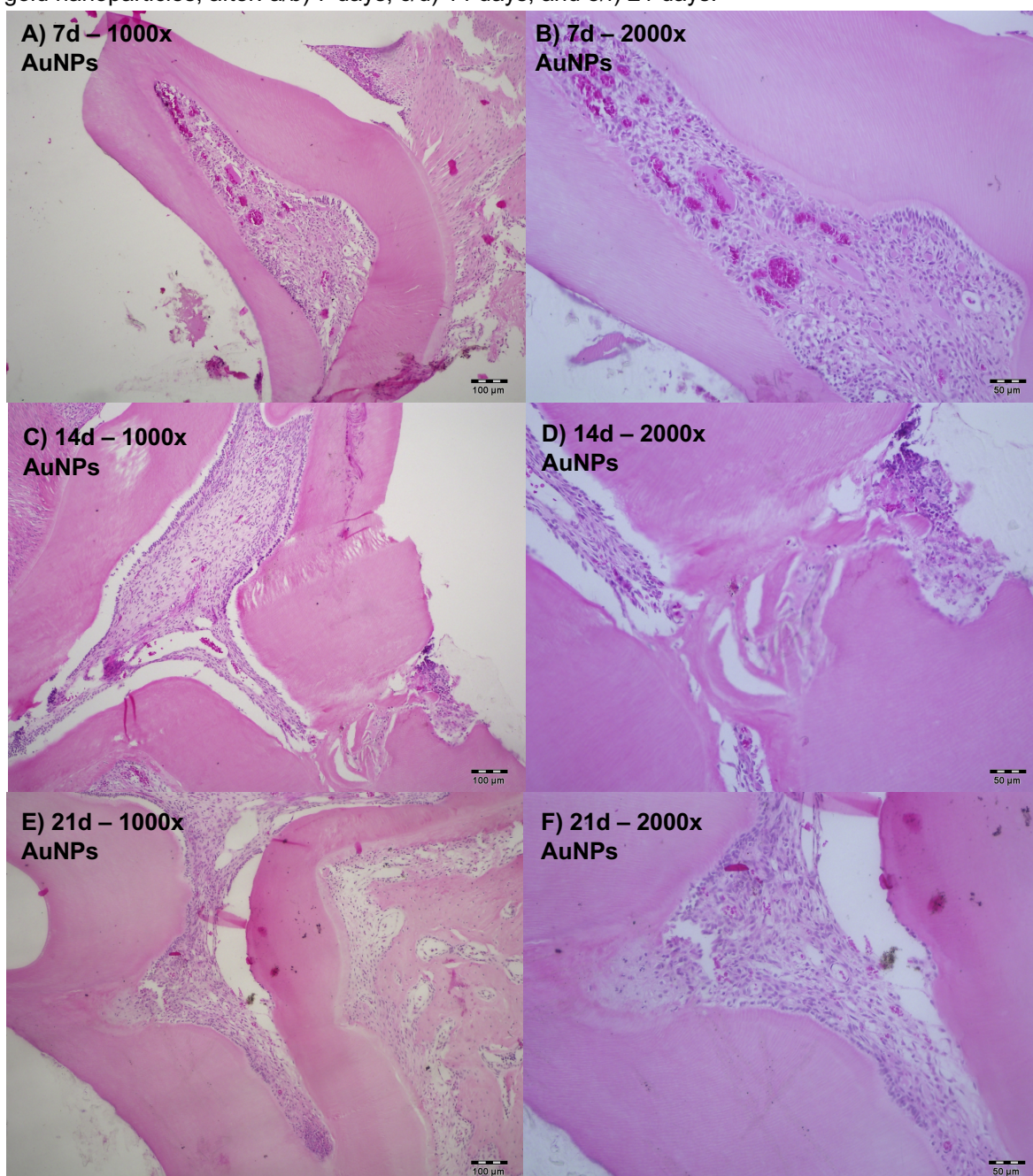
Figure 5.18 - Photomicrographs of pulp tissue response to direct pulp capping with calcium hydroxide (CaOH), after: a/b) 7 days; c/d) 14 days; and e/f) 21 days.



Note: H&E-stained sections showed the dentin bridge formation process.

The application of AuNPs on the pulp tissue showed a moderate inflammatory infiltrate after 7 days, with the presence of congested blood vessels and the absence of dentin bridge formation. After 14 days it is still possible to verify some fragments of dentin and the onset of dentin bridge formation with a moderate inflammatory infiltrate. After 21 days few samples demonstrated the formation of a repair dentin bridge associated with superficial tissue necrosis and a moderate inflammatory infiltrate (figure 5.19).

Figure 5.19 - Photomicrographs of pulp tissue response to direct pulp capping with ascorbic acid-coated gold nanoparticles, after: a/b) 7 days; c/d) 14 days; and e/f) 21 days.



Note: H&E-stained sections showed the dentin bridge formation process.

Discussion

Immediately after the pulp tissue injury, an inflammatory response begins, which involves vascular changes, leading to changes in hemodynamics and increased vascular permeability. The first major change is vasodilation, which may be preceded by transient vasoconstriction lasting a few minutes.¹² Our study demonstrated lower PBF values immediately after pulp exposure and restoration procedure in all groups, probably due to this transient vasoconstriction. It is important to note that the PBF values were reestablished in the other evaluation periods.

PBF measurements were performed during the entire experimental period (21 days) in order to diagnose possible pulp necrosis, which would indicate the failure of conservative pulp therapy. Studies point to LDF as the gold standard for diagnosing pulp condition,²⁸ with a decrease in PBF of about 35% in partially necrotic pulp tissues.²⁹ In addition, a study conducted by our study group showed that the LDF technique was efficient in discriminating necrotic pulp tissue from healthy pulp tissue in the first molars of rats with adequate values of sensitivity and specificity. The results of LDF demonstrated the absence of pulp tissue necrosis in all animals, which was confirmed by histology.

The calcium hydroxide induces the formation of a scar at the surface of the exposed pulp in response of its highly alkaline pH,¹ promoting ectopic calcifications, which may decrease the size of the pulp chamber and reducing the pulp repair response potential to subsequent aggressions.³⁰ This can result in lower values of vascular parameters due to the decrease in pulp tissue volume, as occurred in our study 21 days after CaOH capping. The use of AuNPs on the pulp tissue favored the dentin bridge formation compared to the isolated use of cotton, but it had a lower performance compared to CaOH. In addition, the use of cotton alone promoted more severe inflammatory conditions than with the use of AuNPs and CaOH, which showed similar results.

The mechanical aggression of the drill, the pulp exposure procedure and the application of a therapeutic agent into the pulp can induce inflammation.^{1,3} However, an environment with an intense inflammatory response, rich in inflammatory mediators and cellular activity, can develop a chronic inflammatory condition, inhibiting pulp tissue regenerative responses and stimulating cell death.^{31,32} Therefore, the use of a pulp protection material that negatively regulates the intensity of the inflammatory

response and making the acute phase of inflammation shorter could accelerate the process of tissue repair.

AuNPs have a significant anti-inflammatory action, being able to interfere with the activation of NF- κ B, an important transcription factor of inflammatory mediators.³³ AuNPs act by decreasing the transcription activity of pro-inflammatory cytokines limiting the activation of the pro-inflammatory pathway of NF- κ B. This phenomenon occurs through the inhibition of I κ B-kinases, which are responsible for the activation of NF- κ B through the degradation of its inhibitory portion.^{16,34-36} The presence of TNF- α and IL-1 β decreases collagen synthesis and promotes the degradation of collagen produced by pulp fibroblasts,³⁷ which can impede odontogenesis and pulp tissue regeneration.³⁸ Thus, the use of AuNPs as pulp capping material can be beneficial in controlling tissue inflammation and predisposing to pulp repair. Hozhabri and collaborators³⁸ demonstrated that reducing NF- κ B pathway activity in pulp stem cells suppresses the action of inflammatory mediators on these cells in vitro, increasing odontoblastic differentiation and collagen matrix synthesis of repair dentin, which was found by the increased expression of odontoblastic marker genes, such as dentin, nestin, and alkaline phosphatase.

However, extrapolation of these results in vitro to the in vivo condition should be performed with caution. In the in vivo environment, bacterial contamination during pulp exposure can act as an additional challenge for the repair process,^{1,3} in view of the strictly controlled and sterile environment where in vitro studies in cell culture are carried out. Our results demonstrated that the probable interference in inflammatory response with the use of AuNPs delayed the repair process, evidenced by the low induction of formation of dentin bridge and alteration of tissue integrity. One study indicates that resin components can also reduce the immune response of the pulp, reducing the capacity of defense of the tissue against bacterial contamination.³⁹ This occurred because, although the intense inflammatory response is prejudicial to the tissues and disrupt the repair responses,³¹⁻³² suppressing this inflammatory response can compromise the control and elimination of the bacterial inoculum, as it is known that the inflammatory response is essential for an adequate "cleaning" of the environment to promote the final stages of tissue repair, which does not occur in a contaminated environment.^{1,3} In addition, inflammation is crucial for stem cell

recruitment and differentiation into odontoblast-like cells and for the synthesis of reparative dentin matrix.^{1,3,40,41}

In some teeth capped with sterile cotton, the inflammatory response alone was able to control the bacterial inoculum, allowing the process of repair and formation of mineralized matrix, even without the use of a suitable material for this. Studies have shown that the rat molar pulp has a self-repair capacity with auto-deposition of osteodentin-like matrix after pulp exposure.^{23,42,43} The placement of a well-sealed definitive restoration is a critical factor for the success of conservative pulp therapy,^{3,44-47} limiting the bacterial inoculum and allowing the normal course of defense responses and tissue repair.

Thus, the control of the bacterial inoculum seems to be even more important than modulating the intensity of the inflammatory response by itself, in addition to being an indirect way of controlling it, considering that a large bacterial inoculum will promote an intense inflammatory response. The association of AuNPs with a material that accelerates and stimulates the deposition of dentin matrix and that has some antimicrobial effect can be indicated to more efficiently exploit the anti-inflammatory effect of AuNPs. CaOH itself has such properties. The associated use of CaOH P.A. with the dispersion of AuNPs in paste form can be a promising treatment in direct pulp capping, considering that the isolated use of CaOH has always produced some degree of inflammatory response.

Conclusion

The direct pulp capping using the different pulp agents promotes changes in pulp micro vascularization immediately after the procedure, inducing a decrease in PBF in response to transient vasoconstriction. However, the PBF is restored to normal values and remained throughout the experimental period. Only the CaOH promotes a significant decrease in PBF, which can be explained by superficial pulp necrosis of the tissue and decrease in the size of the pulp chamber induced by the formation of mineralized matrix. The AuNPs did not interfere with the severity of pulp inflammation after capping, and did not induce dentin bridge formation, whereas CaOH showed superior performance in this parameter.

References

- 1- GOLDBERG, M.; FARGES, J.C.; LACERDA-PINHEIRO, S.; SIX, N.; JEGAT, N.; DECUP, F.; SEPTIER, D.; CARROUEL, F.; DURAND, S.; CHAUSSAIN-MILLER, C.; DENBESTEN, P.; VEIS, A.; POLIARD, A. Inflammatory and immunological aspects of dental pulp repair. **Pharmacological Research**, v. 58, n. 2, p. 137–147, 2008.
- 2- CAVALCANTI, B.N.; RODE, S.M.; FRANÇA, C.M.; MARQUES, M.M. Pulp capping materials exert an effect on the secretion of IL-1 β and IL-8 by migrating human neutrophils. **Brazilian Oral Research**, v. 25, n. 1, p.13-8, 2011.
- 3- HILTON, T.J. Keys to clinical success with pulp capping: a review of the literatura. **Operative Dentistry**, v. 34, n. 5, p. 615-625, 2009.
- 4- OLSSON, H.; PETERSSON, K.; ROHLIN, M. Formation of a hard tissue barrier after pulp cappings in humans. A systematic review. **International Endodontic Journal**, v. 39, n. 6, p. 429-42, 2006.
- 5- DELFINO, C.S.; RIBEIRO, C.; VIEIRA, G.F.; BRESSIANI, H.A.A.; TURBINO, M.L. Uso de novos materiais para o capeamento pulpar (hidroxiapatita- HAp e fosfato tricálcico- β -TCP). **Cerâmica**, v. 56, n. 340, p. 381-388, 2010.
- 6- QUEIROZ, A. M. et al. MTA and calcium hydroxide for pulp capping. **Journal of Applied Oral Science**, Bauru, v. 13, n. 2, p. 126-130, 2005.
- 7- ACCORINTE, M.L.; LOGUERCIO, A.D.; REIS, A.; CARNEIRO, E.; GRANDE, R.H.; MURATA, S.S.; HOLLAND, R. Response of human dental pulp capped with MTA and calcium hydroxide powder. **Operative Dentistry**, v. 33, n. 5, p. 488-95, 2008.
- 8- WILLERSHAUSEN, B.; WILLERSHAUSEN, I.; ROSS, A.; VELIKONJA, S.; KASAJ, A.; BLETTNER, M. Retrospective study on direct pulp capping with calcium hydroxide. **Quintessence International**, v. 42, n. 2, p. 165-71, 2011.
- 9- COX, C.F.; SUBAY, R.K.; OSTRO, E.; SUZUKI, S.; SUZUKI S.H. Tunnel defects in dentin bridges: their formation following direct pulp capping. **Operative Dentistry**, v. 21, n. 1, p. 4-11, 1996.
- 10- HEDGE, S.; SOWMYA, B.; MATHEW, S.; BHANDI, S.H.; NAGARAJA, S.; DINESH, K. Clinical evaluation of mineral trioxide aggregate and biodentine as direct pulp capping agents in carious teeth. **Journal of Conservative Dentistry**, v. 20, n. 2, p. 91-95, 2017.
- 11- GOLDBERG, M.; NJEH, A.; UZUNOGLU, E. Is pulp inflammation a prerequisite for pulp healing and regeneration? **Mediators of Inflammation**. v. 2015, Article ID 347649, 11 pages, 2015.
- 12- TONDER, K. J. H. Vascular Reactions in the Dental Pulp During Inflammation. **Acta Odontologica Scandinavica**, v. 41, n. 4, p. 247–256, 1983.

- 13- MIYASHITA, H.; WORTHINGTON, H.V.; QUALTROUGH, A.; PLASSCHAERT, A. Pulp management for caries in adults: Maintaining pulp vitality. **The Cochrane Database of Systematic Reviews**, Art No: CD004484, v. 18, n. 2, 2007.
- 14- SPERLING, R.A.; RIVERA GIL, P.; ZHANG, F.; ZANELLA, M.; PARAK, W.J. Biological applications of gold nanoparticles. **Chemical Society Reviews**, v. 37, n. 9, p. 1896-908, 2008.
- 15- HASHIMOTO, M.; SASAKI, J.I.; YAMAGUCHI, S.; KAWAI, K.; KAWAKAMI, H.; IWASAKI, Y.; IMAZATO, S. Gold Nanoparticles Inhibit Matrix Metalloproteases without Cytotoxicity. **Journal of Dental Research**, v. 94, n. 8, p. 1085-91, 2015.
- 16- JEON, K.I.; BYUN, M.S.; JUE, D.M. Gold compound auranofin inhibits IkappaB kinase (IKK) by modifying Cys-179 of IKKbeta subunit. **Experimental and Molecular Medicine**, v. 35, n. 2, p. 61-66, 2003.
- 17- MA, J.S. et al. Gold nanoparticles attenuate LPS-induced NO production through the inhibition of NF-kappaB and IFN-beta/STAT1 pathways in RAW264.7 cells. **Nitric Oxide**, v. 23, n. 3, p. 214-219, 2010.
- 18- SUMBAYEV, V.V. et al. Gold nanoparticles downregulate interleukin-1beta-induced pro-inflammatory responses. **Small**, v. 9, n. 3, p. 472-7, 2013.
- 19- VICTOR, E.G.; SILVEIRA, P.C.; POSSATO, J.C.; DA ROSA G.L.; MUNARI U.B.; DE SOUZA C.T., et al. Pulsed ultrasound associated with gold nanoparticle gel reduces oxidative stress parameters and expression of pro-inflammatory molecules in an animal model of muscle injury. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 10, n. 11, 2012.
- 20- TURKEVICH, J. STEVENSON P.C.; HILLIER, J. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. **Discussions of the Faraday Society**, v.11, p. 55-75, 1951.
- 21- TYAGI, H.; KUSHWAHA, A.K.; KUMAR, A.; ASLAM, M.M. pH-Dependent synthesis of stabilized gold nanoparticles using ascorbic acid. **International Journal of Nanoscience**, v. 10, n. 04-05, p. 857-860, 2011.
- 22- LANGENBACH, F.; HANDSCHEL, J. 2013 Effects of dexamethasone, ascorbic acid and β -glycerophosphate on the osteogenic differentiation of stem cells in vitro. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 4, n. 5, p.117, 2013.
- 23- TRONGKIJ, P.; SUTIMUNTANAKUL, S; LAPTHANASUPKUL, P.; CHAIMANAKARN, C.; WONG, R.; BANOMYONG, D. Effects of the exposure site on histological pulpal responses after direct capping with 2 calcium-silicate bases cements in a rat model. **Restorative Dentistry & Endodontics**, v. 43, n. 4, p. e36, 2018.
- 24- SABIR, A.; TABBU, C.R.; AUGUSTIONO, P.; SOSROSENO, W. Histological analysis of rat dental pulp tissue capped with própolis. **Journal of Oral Science**, v. 47, n. 3, p. 135-38, 2005.

- 25- KIRK, E.E.J.; LIM, K.C.; KHAN, M.O.G. A comparison of dentinogenesis on pulp capping with calcium hydroxide in paste and cement form. **Oral Surgery, Oral Medicine, and Oral Pathology**, v. 68, n. 2, p. 210-19, 1989.
- 26- CUPERTINO, R.R.; FABRI, F.V.; CELTRINI, V.C.; HIDALGO, M.; BRUSCHI, M.L.; OLIVEIRA, M.M.W. Histological evaluation of the rat dental pulp after indirect capping with sildenafil or L-NAME incorporated into a bioadhesive thermoresponsive system. **Acta Scientiarum. Health Sciences**. Maringá, v. 38, n. 1, p. 95-101, 2016.
- 27- POPOVIC-BAJIC, M.; PROKIC, B.; PROKIC, B.B.; JOKANOVIC, V.; DANILOVIC, V.; ZIVKOVIC, S. Histological evaluation of direct pulp capping with novel nanostructural materials based on active silicate cements and Biodentine® on pulp tissue. **Acta Veterinaria (Beograd)**, v. 63, n. 2-3, p. 347-60, 2013.
- 28- ALGHAITHY, R.A.; QUALTROUGH, A.J.E. Pulp sensibility and vitality tests for diagnosing pulpal health in permanent teeth: a critical review. **International Endodontic Journal**, v. 50, n. 2, p. 135–142, 2017.
- 29- KIM, S.; LIU, M.; SIMCHON, S.; DORSCHER-KIM, J.E. Effect of selected inflammatory mediators on blood flow and vascular permeability in the dental pulp. **Proceedings of the Finnish Dental Society**, v. 88, n. 1, p. 387-92, 1992.
- 30- HERRERA, H.; HERRERA, H.; SILVA, F.W.G.P.; LEONARDO, M.R.; SILVA, L.A.B. Large apical periodontitis healing follow in root canal dressing with calcium hydroxide: a case report. **Revista Odonto Ciência**, Porto Alegre, v. 26, n. 2, p. 172-5, 2011.
- 31- COOPER, P.R.; TAKAHASHI, Y.; GRAHAM, L.W., et al. Inflammation-regeneration interplay in the dentine-pulp complex. **Journal of Dentistry**, v. 38, n. 9, p. 687–97, 2010.
- 32- COOPER, P.R.; HOLDER, M.J.; SMITH, A.J. Inflammation and Regeneration in the Dentin-Pulp Complex: A Double-edged Sword. **Journal of Endodontics**, v. 40, n. 4, p. S46–S51. 2014.
- 33- BAEUERLE, P.A.; HENKEL, T. Function and activation of NF-kappa B in the immune system. **Annual Review of Immunology**, v. 12, p. 141-79, 1994.
- 34- JEON, Y.J.; KIM, Y.K.; LEE, M.; PARK, S.M.; HAN, S.B.; KIM, H.M. Radicicol suppresses expression of inducible nitric-oxide synthase by blocking p38 kinase and nuclear factor-kappaB/Rel in lipopolysaccharide-stimulated macrophages. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 294, n. 2, p. 548-54, 2000.
- 35- BONDESON, J.; SUNDLER, R. Auranofin inhibits the induction of interleukin 1 beta and tumor necrosis factor alpha mRNA in macrophages. **Biochemical Pharmacology**, v. 50, n. 11, p. 1753-9, 1995.
- 36- NORTON, S. A brief history of potable gold. **Molecular Interventions**, v. 8, n. 3, p. 120-3, 2008.
- 37- WISITHPHROM, K.; WINDSOR, L. The Effects of Tumor Necrosis Factor- α , Interleukin-1 β , Interleukin-6, and Transforming Growth Factor- β 1 on Pulp Fibroblast

Mediated Collagen Degradation. **Journal of Endodontics**, v. 32, n. 9, p. 853-861, 2006.

38- HOZHABRI, N.S.; BENSON, M.D.; VU, M.D.; PATEL, R.H.; MARTINEZ, R.M.; NAKHAIE, F.N.; KIM, H.K.; VARANASI, V.G. Decreasing NF- κ B expression. Enhances odontoblastic differentiation and collagen expression in dental pulp stem cells exposed to inflammatory cytokines. **PLoS One**, v. 10, n. 1, p. e0113334, 2015.

39- JONTELL, M. HANKS, C.; BRATEL, J.; BERGENHOLTZ, G. Effects of unpolymerized resin components on the function of accessory cells derived from the rat incisor pulp. **Journal of Dental Research**, v. 74, n. 5, p. 1162-7, 1995.

40- PEVSNER-FISCHER, M.; MORAND, V.; COHEN-SFADY, M.; ROUSSO-NOORI, L.; ZANIN-ZHOROV, A.; COHEN, S. et al. Toll-like receptors and their ligands control mesenchymal stem cell functions. **Blood**, v. 109, n. 4, p. 1422-32, 2007.

41- YUMOTO, H.; HIRAO, K.; HOSOKAWA, Y.; KURAMOTO, H.; TAKEGAWA, D.; NAKANISHI, T.; MATSUO, T. The roles of odontoblasts in dental pulp innate immunity. **Japanese Dental Science Review**, v. 54, n. 3, p. 105-17, 2018.

42- SIX, N.; LASFARGUES, J.J.; GOLDBERG, M. Differential repair responses in the coronal and radicular areas of the exposed rat molar pulp induced by recombinant human bone morphogenetic protein 7 (osteogenic protein 1). **Archives of Oral Biology**, v. 47, p. 177-87, 2002.

43- DECUP, F.; SIX, N.; PALMIER, B.; BUCH, D.; LASFARGUES, J.J.; SALIH, E.; GOLDBERG, M. Bone sialoprotein-induced reparative dentinogenesis in the pulp of rat's molar. **Clinical Oral Investigation**, v. 4, p. 110-9, 2000.

44- HANDELMAN, S.; WASHBURN, F.; WOPPERER, P. Two-year report of sealant effect on bacteria in dental caries. **Journal of the American Dental Association**, v. 93, p. 967-970, 1976.

45- BESIC, F. The fate of bacteria sealed in dental cavities. **Journal of Dental Research**, v. 22, n. 5, p. 349-54, 1943.

46- RIBEIRO, C.; BARATIERI, L.; PERDIGÃO, J.; BARATIERI, N.; RITTER, A. A clinical, radiographic, and scanning electron microscopic evaluation of adhesive restorations on carious dentin in primary teeth. **Quintessence International**, v. 30, n. 9, p. 591-9, 1999.

47- BAUME, L.; HOLZ, J. Long-term clinical assessment of direct pulp capping. **International Dental Journal**, v. 31, n. 4, p. 251-60, 1981.

6 DISCUSSÃO

O ácido ascórbico, devido ao seu potencial de redução, pode ser empregado para a síntese de AuNPs, promovendo a formação de nanopartículas com morfologia próxima à esférica, com tamanho de 30 a 40 nm.⁸⁷ Nossos resultados demonstraram que as AuNPs estabilizadas com ácido ascórbico recém-sintetizadas apresentavam o formato esférico e tamanho de 35 ± 11 nm. O perfil aniônico das AuNPs evidenciado pelo valor do potencial Zeta indica seu menor potencial de toxicidade, pois partículas com perfil catiônico podem promover danos celulares por provocar o rompimento de membrana celular carregada negativamente.^{94,95}

Apesar do ouro ser considerado biologicamente inerte,¹⁰⁶ a sua forma coloidal em tamanho nanométrico favorece sua interação com tecidos, células e organelas,^{107,108} aumentando seu potencial de toxicidade.^{73,109} Os testes *in vitro* indicaram a biocompatibilidade das AuNPs com fibroblastos 3T3, macrófagos J774 e CIPDH, sendo capazes de diminuir a viabilidade das células de cultura primária apenas após 48 horas de exposição às três maiores concentrações. Entretanto, segundo proposto pela ISO 10933-5:2009¹¹⁰, a qual guia a execução de testes *in vitro* de citotoxicidade, para um material ser considerado citotóxico a sua concentração mais alta deve promover valores de viabilidade celular abaixo de 70%, o que não ocorreu com nossas AuNPs, indicando a ausência de citotoxicidade do material.

Uma das propriedades mais importantes das AuNPs é sua capacidade anti-inflamatória, limitando a ativação da via de transcrição genética do NF- κ B, a qual é responsável pela transcrição de diversos mediadores inflamatórios nas células. Elas atuam interferindo na ativação de enzimas que degradam a porção inibitória do NF- κ B, impedindo sua transmigração para o núcleo e transcrição de mediadores inflamatórios.^{12,13,74-76} Porém, as propriedades biológicas das AuNPs estão intimamente relacionadas a suas características físico-químicas, como seu tamanho e formato, as quais são definidas pelo material de superfície utilizado e pelo processo de síntese.^{90,91} Desta forma, nossos experimentos *in vitro* demonstraram que as AuNPs estabilizadas com ácido ascórbico apresentam efeito anti-inflamatório, evidenciado pela diminuição na liberação de TNF- α por macrófagos estimulados por LPS.

No tecido pulpar, um ambiente rico em sinalizações inflamatórias por período prolongado impede a odontogênese e compromete a qualidade e a velocidade do reparo do tecido pulpar.^{111,112} A presença de TNF- α e IL-1B diminui a síntese de colágeno além de promover a degradação do colágeno produzido por fibroblastos pulpares.¹¹² TNF- α e IL-1B juntamente com o LPS são reconhecidos via TLR em células tronco pulpares e estimulam a via do NF- κ B, pela qual outras citocinas pró-inflamatórias são produzidas, acentuando a resposta.^{36,41,113} Assim, a via do NF- κ B pode ser um alvo importante para inibir a inflamação pulpar.⁴¹ Hozhabri et al. (2015)¹¹¹ demonstraram de forma *in vitro* que a redução da atividade da via do NF- κ B em células pulpares diminui a ação de citocinas pró-inflamatórias, aumentando a expressão de marcadores odontoblásticos, como sialofosfoproteína dentinária, nestin e fosfatase alcalina, favorecendo a diferenciação de odontoblastos, produção de matriz colágena e o processo de reparo dentinário.

Um estudo aponta a utilização de resinas restauradoras que podem facilitar o processo de reparo pulpar devido à incorporação de um agente antioxidante com mecanismo de ação semelhante ao das nanopartículas de ouro, a N-acetilcisteína.¹¹⁴ Este composto é capaz de limitar a ativação da via do NF- κ B e a consequente liberação de citocinas responsáveis por acentuar a resposta inflamatória.¹¹⁴ Desta forma, é possível inferir que as AuNPs, devido a sua ação de inibir a ativação do NF- κ B, podem atuar minimizando a resposta inflamatória pulpar, proporcionando um ambiente mais propício para a reparação dos tecidos duros dentários, tendo a vista a necessidade do controle da intensidade da resposta inflamatória para predispor ao reparo do tecido pulpar.³⁵ Entretanto, até o momento não foram conduzidos estudos *in vivo* a cerca da aplicação de AuNPs sobre a inflamação pulpar.

Tendo em vista a evidência do efeito anti-inflamatório das AuNPs *in vitro* faz-se importante avaliar o efeito *in vivo*. Desta forma, o modelo de inflamação pulpar torna-se um modelo controlado, onde é possível isolar o tecido do meio externo e o meio bucal, e extremamente sensível a alterações inflamatórias, tendo em vista a criticidade da progressão da resposta inflamatório e desenvolvimento de um quadro de necrose, pela baixa distensibilidade do tecido pulpar.⁴⁵ As vantagens do modelo, aliado a necessidade clínica do desenvolvimento de novos materiais de capeamento pulpar torna o modelo interessante para a avaliação do potencial anti-inflamatório das AuNPs *in vivo*. Porém, o componente microbiológico apresenta um desafio a mais

neste modelo e no reparo do tecido pulpar, que deve ser considerado no momento da interpretação dos resultados.

Nosso estudo testou o efeito das AuNPs estabilizadas com ácido ascórbico aplicadas como material de capeamento em exposições pulpares em molares de ratos. Entretanto, as AuNPs não controlaram a resposta inflamatória, nem favoreceram a formação de matriz mineralizada. No ambiente *in vivo*, a contaminação pulpar promovida pela exposição atua como um desafio adicional para o processo de reparo,^{1,2} ao contrário do ambiente estéril e rigorosamente controlado dos estudos *in vitro* em cultura de células. Desta forma, apesar da resposta inflamatória exacerbada atrasar a qualidade e a velocidade do reparo tecidual,^{36,111,112} a ação supressora da resposta inflamatória promovida pelas AuNPs pode ter comprometido a eliminação do inóculo de microrganismos. A resposta inflamatória é essencial para promover as fases regenerativas, as quais não ocorrem em um ambiente amplamente contaminado.^{1,2}

Por fim, controlar o grau de contaminação do tecido pulpar parece ser mais importante do que modular a intensidade da resposta inflamatória por si só. Indiretamente, controlando-se o grau de disseminação de microrganismos controla-se a intensidade de resposta inflamatória, criando um ambiente propício para que etapas regenerativas se desenvolvam. Isto pode ser evidenciado por estudos que apontam que o selamento apropriado da cavidade é o fator crítico para o sucesso de terapias pulpares conservadoras por evitar recontaminação pulpar.^{1,115} O selamento efetivo da cavidade dentária após um capeamento pulpar direto parece ser mais importante do que a escolha do material utilizada para a proteção pulpar.^{116,117,118} No presente estudo, após a aplicação das AuNPs sobre a exposição pulpar, a cavidade recebeu um pequeno fragmento de algodão e foi selada com resina composta flow e adesivo dentinário autoadesivo, a fim de garantir um efetivo selamento.

Entretanto, apesar do efeito anti-inflamatório *in vitro* das AuNPs já estabelecido,¹²⁻¹⁴ a literatura aponta seu efeito anti-microbiano limitado,^{16,17} especialmente quando comparado a outras nanopartícula metálicas, como as nanopartículas de prata.⁷² Durante a utilização das AuNPs sobre o tecido pulpar exposto, a baixa efetividade antimicrobiana pode inviabilizar seu uso isolado como material de capeamento pulpar. Desta forma, o presente estudo não conseguiu demonstrar efeito anti-inflamatório das AuNPs no modelo de inflamação pulpar pela exposição desse tecido.

É evidente a necessidade de testar a efetividade da ação anti-inflamatória das AuNPs capeadas com ácido ascórbico em outros modelos de inflamação *in vivo*, assim como já demonstrado com as AuNPs capeadas com citrato de sódio,¹⁰⁻¹² inclusive pelo nosso grupo de pesquisa. Por fim, com a evidência do seu potencial anti-inflamatório, para utilizar essas AuNPs capeadas com ácido ascórbico como material de capeamento pulpar deve-se considerar associá-las com uma substância que tenha efeito antimicrobiano e que estimule e favoreça uma deposição precoce de tecido mineralizado (como fontes de fosfato) formando uma barreira física para a recontaminação, podendo assim explorar melhor a ação anti-inflamatórias das AuNPs.

Contudo, as AuNPs, apesar de apresentar um metal nobre em sua composição primária, pode ser uma alternativa com custo acessível para tratamento de inflamação pulpar, pois os íons de ouro são obtidos a partir de uma solução do precursor metálico ácido tetracloroáurico, o qual não apresenta um custo elevado tendo em vista seu grande rendimento no processo de síntese das AuNPs, e a quantidade mínima necessária para a aplicação sobre o tecido pulpar.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O emprego do ácido ascórbico no processo de síntese de nanopartículas de ouro é eficiente, produzindo nanopartículas com morfologia esférica e diâmetro de 35 ± 11 nm. O nanomaterial não apresenta efeito citotóxico sobre cultura de fibroblastos 3T3, macrófagos J774 e cultura primária de células indiferenciadas de polpa dental humana (CIPDH), além de apresentar ação anti-inflamatória *in vitro*, diminuindo a produção de TNF- α em macrófagos J774 estimulados por LPS.

A FLD é adequada para discriminar necrose pulpar do tecido pulpar saudável em primeiros molares superiores de ratos, com uma área sob a curva ROC de 0,899. O método apresenta valores de sensibilidade e 100%, especificidade de 90% e acurácia de 95%. Entretanto, o método não é adequado para diagnosticar quadros de inflamação pulpar devido à heterogeneidade da extensão e intensidade da resposta inflamatória na amostra produzida pela resposta biológica individual de cada animal e por variabilidades inerentes à técnica de exposição pulpar experimental.

Por fim, a aplicação das AuNPs sobre exposições pulpares não promove a formação de dentina reparadora de maneira satisfatória, além de não interferir na intensidade da resposta inflamatória. Assim, sugere-se realizar novos estudos acerca do uso das AuNPs para o capeamento pulpar direto associado com outros materiais que apresentem importantes propriedades antimicrobianas e que promovam a formação de dentina reparadora, como o próprio hidróxido de cálcio, a fim de investigar benefícios adicionais.

REFERÊNCIAS

- 1- HILTON, T.J. Keys to clinical success with pulp capping: a review of the literatura. **Operative Dentistry**, v. 34, n. 5, p. 615-625, 2009.
- 2- GOLDBERG, M.; FARGES, J.C.; LACERDA-PINHEIRO, S.; SIX, N.; JEGAT, N.; DECUP, F.; SEPTIER, D.; CARROUEL, F.; DURAND, S.; CHAUSSAIN-MILLER, C.; DENBESTEN, P.; VEIS, A.; POLIARD, A. Inflammatory and immunological aspects of dental pulp repair. **Pharmacological Research**, v. 58, n. 2, p. 137–147, 2008.
- 3- FARGES, J.C.; LICHT, B.B.; BAUDOUIN, C.; MSIKA, P.; BLEICHER, F.; CARROUEL, F. Odontoblast control of dental pulp inflammation triggered by cariogenic bacteria. **Frontiers in Physiology**, v. 4, article 326, p. 1-3, 2013.
- 4- ZEGLAM, M.S.; ARARA, A.S. Calcium hydroxide in dentistry: a review. **BAOJ Dentistry**, v. 2, n. 4, 024, 2017.
- 5- ACCORINTE, M.L.; LOGUERCIO, A.D.; REIS, A.; CARNEIRO, E.; GRANDE, R.H.; MURATA, S.S.; HOLLAND, R. Response of human dental pulp capped with MTA and calcium hydroxide powder. **Oper Dent.**, v. 33, n. 5, p. 488-95, 2008.
- 6- WILLERSHAUSEN, B.; WILLERSHAUSEN, I.; ROSS, A.; VELIKONJA, S.; KASAJ, A.; BLETTERN, M. Retrospective study on direct pulp capping with calcium hydroxide. **Quintessence Int.**, v. 42, n. 2, p. 165-71, 2011.
- 7- LAVÔR, M. L. T., et al. Uso de hidróxido de cálcio e MTA na odontolgia: conceitos, fundamentos e aplicação clínica. **Salusvita**, Bauru, v. 36, n. 1, p. 99-121, 2017.
- 8- PIVA, E.; DA ROSA, W.L.O.; COCCO, A.R.; DA SILVA, T.M. Systematic review of dental pulp capping materials. **Dental Materials**, v. 32, n. 1, p.e89, 2016.
- 9- HERRERA, et al. Large apical periodontitis healing follow in root canal dressing with calcium hydroxide: a case report. **Revista Odonto Ciência**, Porto Alegre, v. 26, n. 2, p. 172-175, 2011.
- 10- COX, C.F.; SUBAY, R.K.; OSTRO, E.; SUZUKI, S.; SUZUKI S.H. Tunnel defects in dentin bridges: their formation following direct pulp capping. **Oper Dent.**, v. 21, n. 1, p. 4-11, 1996.
- 11- MIYASHITA, H.; WORTHINGTON, H.V.; QUALTROUGH, A.; PLASSCHAERT, A. Pulp management for caries in adults: Maintaining pulp vitality. **The Cochrane Database of Systematic Reviews**, Art No: CD004484, v. apr 18, n. 2, 2007.
- 12- JEON, K.I.; BYUN, M.S.; JUE, D.M. Gold compound auranofin inhibits IkappaB kinase (IKK) by modifying Cys-179 of IKKbeta subunit. **Experimental and Molecular Medicine**, v. 35, n. 2, p. 61-66, 2003.
- 13- MA, J.S. et al. Gold nanoparticles attenuate LPS-induced NO production through the inhibition of NF-kappaB and IFN-beta/STAT1 pathways in RAW264.7 cells. **Nitric Oxide**, v. 23, n. 3, p. 214-219, 2010.

- 14- SUMBAYEV, V.V. et al. Gold nanoparticles downregulate interleukin-1 β -induced pro-inflammatory responses. **Small**, v. 9, n. 3, p. 472-7, 2013.
- 15- VICTOR, E.G.; SILVEIRA, P.C.; POSSATO, J.C.; DA ROSA G.L.; MUNARI U.B.; DE SOUZA C.T., et al. Pulsed ultrasound associated with gold nanoparticle gel reduces oxidative stress parameters and expression of pro-inflammatory molecules in an animal model of muscle injury. **J Nanobiotechnology**, v. 10, n. 11, 2012.
- 16- YU, Q.; LI, J.; ZHANG, Y.; WANG, Y.; LIU, L.; LI, M. Inhibition of gold nanoparticles (AuNPs) on pathogenic biofilm formation and invasion to host cells. **Scientific Reports – Nature Research**, v.6, 26667, 2016.
- 17- MALISZEWSKA, I.; WRÓBEL, J.; WANARSKA, E.; PODHORODECK, A.; MATCZYSZYN, K. Synergistic affect of methylene blue and biogenic gold nanoparticles against *Enterococcus faecalis*. **Photodiagnosis and photodynamic therapy**, v. 27, p. 218-26, 2019.
- 18- HASHIMOTO, M.; SASAKI, J.I.; YAMAGUCHI, S.; KAWAI, K.; KAWAKAMI, H.; IWASAKI, Y.; IMAZATO, S. Gold Nanoparticles Inhibit Matrix Metalloproteases without Cytotoxicity. **Journal of Dental Research**, v. 94, n. 8, p. 1085-91, 2015.
- 19- LANGENBACH, F.; E HANDSCHEL, J. 2013 Effects of dexamethasone, ascorbic acid and β -glycerophosphate on the osteogenic differentiation of stem cells in vitro. **Stem Cell Res Ther.**, v. 4, n. 5, p.117, 2013.
- 20- FIGUEIRAS, E.M.A. **Métodos e instrumentação para fluxometria laser: aplicações à microcirculação sanguínea**. 2001. 215 f. Tese (Doutorado em Física Tecnológica) – Universidade de Coimbra, Coimbra. 2012.
- 21- ROEYKENS, H.J.; DESCHEPPER, E.; DE MOOR, R.J. Laser Doppler flowmetry: reproducibility, reliability, and diurnal blood flow variations. **Lasers in Medical Science**, v. 31, n. 6, p. 1083-92, ago. 2016.
- 22- SILVEIRA, D.L.; VALE, M.S. Laser Doppler em Endodontia: revisão da literatura. **Journal of the Health Sciences Institute**, v. 30, n. 2, p. 120-4, 2012.
- 23- NOGUEIRA, G. E. C.; ZECELL, D. M.; EDUARDO, L. R. P.; VIEIRA JR., N. D.; BALDOCHI, S. L.; ROSSI, W. Desenvolvimento de um Sensor de Fluxo Sanguíneo via Técnica Laser Doppler. In: **XVII ENC. NACIONAL DE FÍSICA DA MATERIA CONDENSADA**, Florianópolis, p. 1-3, 2000.
- 24- MORAES, M.P. Fluxometria Laser Doppler da polpa dental após clareamento com laser de diodo. São Paulo, 2006. 47 f. Dissertação (Mestrado em Lasers em Odontologia). **Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares**. Autarquia Associada à Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.
- 25- KARAYILMAZ, H.; KIRZIOGLU, Z. Evaluation of pulpal blood flow changes in primary molars with physiological root resorption by laser Doppler flowmetry and pulse oximetry. **The Journal of Clinical Pediatric Dentistry**, v. 36, n. 2, p. 139-44, 2011.

- 26- SABUNCUOGLU, F.A.; ERSAHAN, S. Changes in maxillary molar pulp blood flow during orthodontic intrusion. **Australian Orthodontic Journal**, v. 30, n. 2, p. 152-60, nov. 2014.
- 27- SABUNCUOGLU, F.A.; ERSAHAN, S. Comparative evaluation of pulpal blood flow during incisor intrusion. **Australian Orthodontic Journal**, v. 31, n. 2, p. 171-7, nov. 2015.
- 28- ZERARI-MAILLY, F.; BRAUD, A.; DAVIDO, N.; TOURÉ, B.; AZÉRAD, J.; BOUCHER, Y. Glutamate controlo f pulpal blood flow in the incisor dental pulp of the rat. **European Journal of Oral Science**, v. 120, p. 402–407, 2012.
- 29- YU, C.Y.; BOYD, N.M.; CRINGLE, S.J.; SU, E.N.; ALDER, V.A.; YU, D.Y. An in vivo and in vitro comparision of the effects of vasoactive mediators on pulpal blood vessels in rat incisors. **Archives of Oral Biology**, v. 47, p. 723–732, 2002.
- 30- DAMMASCHKE, T. Rat molar teeth as a study model for direct pulp capping research in dentistry. **Lab Animal**, v. 44, n. 1, p. 1-6, 2010.
- 31- GOLDBERG, M.; KELLERMAN, O.; DIMITROVA-NAKOV, S.; HARICHANE, Y.; BAUDRY, A. Comparative studies between mice molars and incisors are required to draw an overview of enamel structural complexity. **Frontiers in Physiology, Craniofacial biology**, v. 5, article 359, p. 1-6, 2014.
- 32- WARSHAWSKY, H.; JOSEPHSEN, K.; THYLSTRUP, A.; FEJERSKOV, O. The development of enamel structure in rat incisors as compared to the teeth of monkey and man. **The Anatomical Record**, v. 200, n. 4, p. 371-399, 1981.
- 33- GOLDBERG, M. SMITH, A. Cells and extracellular matrices of dentin and pulp. A biological basis for repair and tissue engineering. **Crit Rev Oral Biol Med**, v.15, p. 13–27, 2004.
- 34- GOMES, A.C.; GOMES-FILHO, J.E.; OLIVEIRA, S.H.P. MTA-induced neutrophil recruitment: a mechanism dependent on IL-1, MIP- 2, and LTB4. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 106, n. 3, p. 450-6, 2008.
- 35- COOPER, P.R.; TAKAHASHI, Y.; GRAHAM, L.W., et al. Inflammation-regeneration interplay in the dentine-pulp complex. **Journal of Dentistry**, v. 38, n. 9, p. 687–97, 2010.
- 36- COOPER, P.R.; HOLDER, M.J.; SMITH, A.J. Inflammation and Regeneration in the Dentin-Pulp Complex: A Double-edged Sword. **Journal of Endodontics**, v. 40, n. 4, p. S46–S51. 2014.
- 37- STAQUET, M.J.; DURAND, S.H.; COLOMB, E.; ROMÉAS, A.; VICENT, C.; BLEICHER, F., LEBECQUE, S.; FARGES, J.C. Different roles of odontoblasts and fibroblasts in immunity. **Journal of Dental Research**, v. 87, p. 256-61, 2008.
- 38- DURAND, S.H.; FLACHER, V.; ROMÉAS, A.; CARROUEL, F.; COLOMB, E.; VINCENT C., et al. Lipoteichoic acid increases TLR and functional chemokine expression. While reducing dentin formation in in vitro differentiated human odontoblasts. **Journal of Immunology**, v. 176, n. 5, p. 2880-7, 2006.

- 39- VEERAYUTTHWILAI, O.; BYERS, M.R.; PHAM, T.T.; DARVEAU, R.P.; DALE, B.A. Differential regulation of immune responses by odontoblasts. **Oral Microbiology and Immunology**, v. 22, n. 1, p. 5-13, 2007.
- 40- ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H. *Imunologia celular e molecular*. 7 ed. Rio de Janeiro: Elsevier: 2012.
- 41- CHANG, J.; ZHANG, C.; TANI-ISHII, N.; SHI, S.; WANG, C.Y. NF-kappaB activation in human dental pulp stem cells by TNF and LPS. **Journal of Dental Research**, v. 84, n. 11, p. 994-8, 2005.
- 42- BAEUERLE, P.A.; HENKEL, T. Function and activation of NF-kappa B in the immune system. **Annual Review of Immunology**, v. 12, p. 141-79, 1994.
- 43- CAUX, C.; VANBERVLIET, B.; MASSACRIER, C.; AIT-YAHIA, S.; VAURE, C.; CHEMIM, K. et al. Regulation of dendritic cell recruitment by chemokines. **Transplantation**, v. 73, n. S1, p. 7-11, 2002.
- 44- NOMIYAMA, K.; KITAMURA, C.; TSUJISAWA, T.; NAGAYOSHI, M.; MOROTOMI, T.; TERASHITA, M. et al. Effects of lipopolysaccharide on newly established rat dental pulp-derived cell line with odontoblastic properties. **Journal of Endodontics**, n. 33, n. 10, p. 1187-91, 2007.
- 45- LESOT, H.; BÈGUE-KIRN, C.; KUBLER, M.D.; MEYER, J.M.; SMITH, A.J.; CASSIDY, N. et al. Experimental induction of odontoblast differentiation and stimulation during reparative processes. **Cell and Materials**, v. 3, n. 2, p. 201-17, 1993.
- 46- SIX, N.; TOMPKINS, K.; SEPTIER, D.; VEIS, A.; GOLDBERG, M. Recruitment and characterization of the cells involved in reparative dentin formation in the exposed rat molar pulp after implantation of amelogenin gene splice products A+4 and A-4. **Oral Biosciences & Medicine**, n. 1, p. 35-44, 2004.
- 47- JEGAT, N.; SEPTIER, D.; VEIS, A.; POLIARD, A.; GOLDBERG, M. Short-term effects of amelogenin gene splice products A+4 and A-4 implanted in the exposed rat molar pulp. **Head & Face Medicine**, v. 3, n. 1, p. 30-40, 2007.
- 48- TONDER, K. J. H. Vascular Reactions in the Dental Pulp During Inflammation. **Acta Odontologica Scandinavica**, v. 41, n. 4, p. 247-256, 1983.
- 49- FARNOUSH, A. Mast cells in human dental pulp. **Journal of Endodontics**, v.10, n. 6, p. 250-2, 1984.
- 50- FREITAS, P.; NOVARETTI, C.P.; RODINI, C.O.; BATISTA, A.C.; LARA, V.S. Mast cells and lymphocyte subsets in pulps from healthy and carious human teeth. **Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology and Endodontics**, v. 103, n. 5, p. 95-102, 2007.
- 51- WALSH, L.J. Mast cells and oral inflammation. **Critical Reviews in Oral Biology & Medicine**, v. 14, n.3, p. 188-98, 2003

- 52- GOLDBERG, M.; NJEH, A.; UZUNOGLU, E. Is pulp inflammation a prerequisite for pulp healing and regeneration? **Mediators of Inflammation**, v. 2015, Article ID 347649, 11 pages, 2015.
- 53- CAVALCANTI, B.N.; RODE, S.M.; FRANÇA, C.M.; MARQUES, M.M. Pulp capping materials exert an effect on the secretion of IL-1 β and IL-8 by migrating human neutrophils. **Brazilian Oral Research**, v. 25, n. 1, p.13-8, 2011.
- 54- PEVSNER-FISCHER, M.; MORAND, V.; COHEN-SFADY, M.; ROUSSO-NOORI, L.; ZANIN-ZHOROV, A.; COHEN, S. et al. Toll-like receptors and their ligands control mesenchymal stem cell functions. **Blood**, v. 109, n. 4, p. 1422-32, 2007.
- 55- YUMOTO, H.; HIRAO, K.; HOSOKAWA, Y.; KURAMOTO, H.; TAKEGAWA, D.; NAKANISHI, T.; MATSUO, T. The roles of odontoblasts in dental pulp innate immunity. **Japanese Dental Science Review**, v. 54, n. 3, p. 105-17, 2018.
- 56- EMING, S.A.; KRIEG, T.; DAVIDSON, J.M. Inflammation in wound repair: molecular and cellular mechanisms. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 127, n. 3, p. 514-25, 2007.
- 57- SCHRODER, U. Effects of calcium hydroxide-containing pulp capping agents on pulp cell migration, proliferation, and differentiation. **Journal of Dental Research**, v. 64, p. 541-8, 1985.
- 58- POPOVIC-BAJIC, M.; PROKIC, B.; PROKIC, B.B.; JOKANOVIC, V.; DANILOVIC, V.; ZIVKOVIC, S. Histological evaluation of direct pulp capping with novel nanostructural materials based on active silicate cements and Biodentine® on pulp tissue. **Acta Veterinaria (Beograd)**, v. 63, n. 2-3, p. 347-60, 2013.
- 59- NAIR, P.N.R.; DUNCAN, H.F.; FORD, T.R.P.; LUDER, H.U. Histological, ultrastructural and quantitative investigations on the response of healthy human pulps to experimental capping with mineral trioxide aggregate: a randomized controlled trial. **International Endodontic Journal**, v. 41, n. 2, p. 128-50, 2008.
- 60- PARIOKH, M.; TORABINEJAD, M. Mineral trioxide aggregate: A comprehensive literature reviewPart I: Chemical, physical and antibacterial properties. **Journal of Endodontics**, v. 36, n. 1, p. 16-27, 2010.
- 61- TORABINEJAD, M.; PARIOKH, M. 2010. Mineral trioxide aggregate: A comprehensive literature review-Part II: Leakage and biocompatibility investigations. **Journal of Endodontics**, v. 36, n. 2, p. 190-202, 2010
- 62- ZHU, C.; JU, B.; NI, R. Clinical outcome of direct pulp capping with MTA or calcium hydroxide: a systematic review and meta-analysis. **International Journal of Clinical and Experimental Medicine**, v. 8, n. 10, p. 17055-60, 2015.
- 63- KATGE, F.A.; PATIL, D.P. Comparative Analysis of 2 calcium silicate-based cements (Biodentine and Mineral Trioxide Aggregate) as direct pulp-capping agente in Young permanente molars: a split mouth study. **Journal of Endodontics**, v. 43, n. 4, p. 507-513, 2017.

- 64- HEDGE, S.; SOWMYA, B.; MATHEW, S.; BHANDI, S.H.; NAGARAJA, S.; DINESH, K. Clinical evaluation of mineral trioxide aggregate and biodentine as direct pulp capping agents in carious teeth. **Journal of Conservative Dentistry**, v. 20, n. 2, p. 91-95, 2017.
- 65- SWARUP, S.J.; RAO, A.; BOAZ, K.; SRIKANT, N.; SHENOY, R. Pulpal response to nano hydroxyapatite, mineral trioxide aggregate and calcium hydroxide when used as a direct pulpar capping agente: as in vivo study. **Journal of Clinical Pediatric dentistry**, v. 38, n. 3, p. 201-6, 2014.
- 66- AHANGARI, Z.; NASERI, M.; JALILI, M.; MANSURI, Y.; MASHHADIABBAS, F.; TORJAMAN, A. Effect of própolis on dentin regeneration and the potential role of dental pulp stem cell in guinea pigs. **Cell Journal**, v. 13, n. 4, p. 223-228, 2012.
- 67- RICUCCI, D.; LOGHIN, S.; SIQUEIRA, J.F. Correlation between Clinical and Histologic Pulp Diagnoses. **Journal of Endodontics**, v. 40, n. 12, p. 1932-39, 2014.
- 68- ALGHAITHY, R.A.; QUALTROUGH, A.J.E. Pulp sensibility and vitality tests for diagnosing pulpal health in permanent teeth: a critical review. **International Endodontic Journal**, v. 50, p. 135–142, 2017.
- 69- KIM, S.; LIU, M.; SIMCHON, S.; DORSCHER-KIM, J.E. Effects of selected inflammatory mediators on blood flow and vascular permeability in the dental pulp. **Proceedings of the Finnish Dental Society**, v. 88, n. 1, p. 387-92, 1992.
- 70- FRISTAD, I.; KVINNSLAND, I.H.; JONSSON, R.; HEYERAAS, K.J. Effect of Intermittent long-lasting electrical tooth stimulation on pulpar blood flow and immunocompetent cells: a hemodynamic and immunohistochemical study in Young rat molars. **Experimental Neurology**, v. 146, n. 1, p. 230-9, 1997.
- 71- OBEID, A.N.; DOUGHERTY, G.; PETTINGER, S. In vivo comparison of a twin wavelength laser doppler flowmeter using he-ne and laser diode sources. **Journal of Medical Engineering and Technology**, v. 14, n. 3, p. 102-110, 1990.
- 72- YAMADA, M.; FOOTE, M.; PROW, T.W. Therapeutic gold, silver, and platinum nanoparticles. **Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol.**, v. 7 n. 3, p. 428-45, 2015.
- 73- SPERLING, R.A.; RIVERA GIL, P.; ZHANG, F.; ZANELLA, M.; PARAK, W.J. Biological applications of gold nanoparticles. **Chemical Society Reviews**, v. 37, n. 9, p. 1896-908, 2008.
- 74- JEON, Y.J.; KIM, Y.K.; LEE, M.; PARK, S.M.; HAN, S.B.; KIM, H.M. Radicol suppresses expression of inducible nitric-oxide synthase by blocking p38 kinase and nuclear fator-kappaB/Rel in lipopolysaccharide-stimulated macrophages. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 294, n. 2, p. 548-54, 2000.
- 75- BONDESON, J.; SUNDLER, R. Auranofin inhibits the induct of interleukin 1 beta and tumor necrosis fator alpha mRNA in macrophages. **Biochemical Pharmacology**, v. 50, n. 11, p. 1753-9, 1995.

- 76- NORTON, S. A brief history of potable gold. **Molecular Interventions**, v. 8, n. 3, p. 120-3, 2008.
- 77- MITTAL, M.; SIDDIQUI, M.R.; TRAN, K.; REDDY, S.P.; MALIK, A.B. Reactive oxygen species in inflammation and tissue injury. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 20, n. 7, p. 1126-67, 2014.
- 78- ADCOCK, I.M.; BROWN, C.R.; KWON, O.; BARNES, P.J. Oxidative stress induces NF kappa B DNA binding and inducible NOS mRNA in the human epithelial cell line A549. **Biochemical Society Transactions**, v. 22, n. 2, p.186S, 1994.
- 79- HADDAD, J.J. Oxygen-sensitive pro-inflammatory cytokines, apoptosis signaling and redox-responsive transcription factors in development and pathophysiology. **Cytokines, Cellular & Molecular Therapy**, v. 7, n. 1, p. 1-14, 2002.
- 80- PETERS, L.B.; WESSELINK, P.R.; BUYS, J.F.; VAN WINKELHOFF, A.J. Viable bacteria in root dentinal tubules of teeth with apical periodontitis. **Journal of Endodontics**, v. 27, p. 76-81, 2001.
- 81- SIFRI, C.D.; MYLONAKIS, E.; SINGH, K.V.; QIN, X.; GARSIN, D.A.; MURRAY, B.E.; AUSUBEL, F.M.; CALDERWOOD, S.B. Virulence effect of *Enterococcus faecalis* protease genes and the quorum-sensing locus *fsr* in *Caenorhabditis elegans* and mice. **Infection and Immunity**, v. 70, p. 5647-5650, 2002.
- 82- DUNAVANT, T.R.; REGAN, J.D.; GLICKMAN, G.N.; SOLOMON, E.S.; HONEYMAN, A.L. Comparative evaluation of endodontic irrigants against *Enterococcus faecalis* biofilms. **Journal of Endodontics**, v. 32, p. 527-31, 2006.
- 83- CHÁVEZ DE PAZ, L.E.; BERGENHOLTZ, G.; DAHLÉN, G.; SVENSATER, G. Response to alkaline stress by root canal bacteria in biofilms. **International Endodontics Journal**, n. 40, p. 3443-3355, 2007.
- 84- JAIN, A.; BAHUGUNA, R. Role of matrix metalloproteinases in dental caries, pulp and periapical inflammation: an overview. **Journal of oral biology and Craniofacial Research**, v. 5, n. 3, p. 212-218, 2015.
- 85- JAIN, P.K.; EL-SAYED, I.H.; EL-SAYED, M.A. Au nanoparticles target cancer. **Nano Today**, v. 2, n. 1, p. 18-29, 2007.
- 86- TURKEVICH, J. STEVENSON P.C.; HILLIER, J. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. **Discussions of the Faraday Society**, v.11, p. 55-75, 1951.
- 87- TYAGI, H.; KUSHWAHA, A.K.; KUMAR, A.; ASLAM, M.M. pH-Dependent synthesis of stabilized gold nanoparticles using ascorbic acid. **International Journal of Nanoscience**, v. 10, n. 04-05, p. 857-860, 2011.
- 88- KONG, E.H.; MA, S.Y.; JEONG, J.Y.; KIM, K.H. Effects of L-ascorbic acid on the production of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines in C57BL/6 mouse splenocytes. **Kosin Medical Journal**, v.30, p. 41-49, 2015

- 89- SHUKLA, R.; BANSAL, V.; CHAUDHARY, M.; BASU, A.; BHONDE, R.R.; SASTRY, M. Biocompatibility of gold nanoparticles and their endocytotic fate inside the cellular compartment: a microscopic overview. **Langmuir**, v. 21, n. 23, p. 10644–10654, 2005.
- 90- HUANG, G.T.; SHAGRAMANOVA, K.; CHAN, S.W. Formation of odontoblast-like cells from cultured human dental pulp cells on dentin in vitro. **Journal of Endodontics**, v.32, n.11, p. 1066-73, 2006.
- 91- BHATTACHARYA, R.; MUKHERJEE, P. Biological properties of “naked” metal nanoparticles. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 60, n. 11, p. 1289-306, 2008.
- 92- PHILIP, D. Synthesis and spectroscopic characterization of gold nanoparticles. **Spectrochimica Acta A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 71, n. 1, p. 80-5, 2008.
- 93- ALKILANY, A.M.; MURPHY, C.J. Toxicity and cellular uptake of gold nanoparticles: what we have learned so far? **Journal of Nanoparticle Research**, v.12, n.7, p. 2313-33, 2010.
- 94- CLOGSTON, J.D.; PATRI, A.K. Zeta potential measurement. **Methods in Molecular Biology**, v.697, p. 63-70, 2011.
- 95- WU, L.; ZHANG, J.; WATANABLE, W. Physical and chemical stability of drug nanoparticles. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 63, n. 6, p. 456-69, 2011.
- 96- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v.65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.
- 97- CRUZ, L.S.; DE OLIVEIRA, T.L.; KANUNFRE, C.C.; PALUDO, K.S.; MINOZZO, B.R.; PRESTES, A.P., et al. Pharmacokinetics and cytotoxic Study of eupgol from *Euphoria umbellata* (Bruyns) Pax latex. **Phytomedicine**, v. 47, p. 105-112, 2018.
- 98- SLOB, A.K.; VAN DER WERFT TEN BOSCH, J.J. Sex differences in body growth in the rat. **Physiology & Behavior**, v. 14, n. 3, p. 353-361, 1975.
- 99- SHANG, L.; HENDERSON, L.B.; CHO, M.T.; PETREY, D.S.; FONG, C.T.; HAUDE, K.M. et al. De novo missense variants in PPP2R5D are associated with intellectual disability, macrocephaly, hypotonia, and autism. **Neurogenetics**, v. 17, n. 1, p. 43-9, 2016.
- 100- ARAÚJO, A.C.A.J. **Avaliação da ansiedade em ratos com lesão periapical**. Dissertação (Mestrado em Clínica Integrada) – Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2016.
- 101- CHIDIAC, J.J.; RAIFI, K.; HAWWA, N.N.; MASSAAD, C.A.; JURJUS, A.R.; JABBUR, S.J.; SAADÉ, N.E. Nociceptive behavior induced by dental application of irritants to rat incisors: A new model for tooth inflammatory pain. **European Journal of Pain**, v. 6, p. 55-67, 2002.

- 102- SABIR, A.; TABBU, C.R.; AUGUSTIONO, P.; SOSROSENO, W. Histological analysis of rat dental pulp tissue capped with própolis. **Journal of Oral Science**, v. 47, n 3, p 135-38, 2005.
- 103- KIRK, E.E.J.; LIM, K.C.; KHAN, M.O.G. A comparison of dentinogenesis on pulp capping with calcium hydroxide in paste and cement form. **Oral Surgery, Oral Medicine, and Oral Pathology**, v. 68, p. 210-19, 1989.
- 104- CUPERTINO, R.R.; FABRI, F.V.; CELTRINI, V.C.; HIDALGO, M.; BRUSCHI, M.L.; OLIVEIRA, M.M.W. Histological evaluation of the rat dental pulp after indirect capping with sildenafil or L-NAME incorporated into a bioadhesive thermoresponsive system. **Acta Scientiarum. Health Sciences**. Maringá, v. 38, n. 1, p. 95-101, 2016.
- 105- POPOVIC-BAJIC, M.; PROKIC, B.; PROKIC, B.B.; JOKANOVIC, V.; DANILOVIC, V.; ZIVKOVIC, S. Histological evaluation of direct pulp capping with novel nanostructural materials based on active silicate cements and Biodentine® on pulp tissue. **Acta Veterinaria (Beograd)**, v. 63, n. 2-3, p. 347-60, 2013.
- 106- HAMMER, B.; NORSKOV, J.K. Why gold is the noblest of all the metals. **Nature**, v. 376, n. 6537, p. 238-40, 1995.
- 107- FISCHER, H.C.; CHAN, W.C. Nanotoxicity: the growing need for in vivo study. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 18, n. 6, p. 565-71, 2007.
- 108- OBERDORSTER, G.; OBERDORSTER, E.; OBERDORSTER, J. Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. **Environmental Health Perspectives**, v. 113, n. 7, p. 823-39, 2005.
- 109- CHEN, Z.; MENG, H.; XING, G.; CHEN, C.; ZHAO, Y.; JIA, G.; et al. Acute toxicological effects of copper nanoparticles in vivo. **Toxicology Letters**, v. 163, n. 2, p. 109-20, 2006.
- 110- International Organization for Standardization. **ISO 10993-5: Biological evaluation of medical devices: Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity**. p. 24. 2009.
- 111- HOZHABRI, N.S.; BENSON, M.D.; VU, M.D.; PATEL, R.H.; MARTINEZ, R.M.; NAKHAIE, F.N.; KIM, H.K.; VARANASI, V.G. Decreasing NF- κ B expression. Enhances odontoblastic differentiation and collagen expression in dental pulp stem cells exposed to inflammatory cytokines. **PLoS One**, v. 10, n. 1, p. e0113334, 2015.
- 112- WISITHPHROM, K.; WINDSOR, L. The Effects of Tumor Necrosis Factor- α , Interleukin-1 β , Interleukin-6, and Transforming Growth Factor- β 1 on Pulp Fibroblast Mediated Collagen Degradation. **Journal of Endodontics**, v. 32, n. 9, p. 853-861, 2006.
- 113- PATEL, M.; SMITH, A.J.; SLOAN, A.J.; et al. Phenotype and behaviour of dental pulp cells during expansion culture. **Archives of Oral Biology**, v. 54, p. 898-908, 2009.
- 114- YAMADA, M.; KOJIM, N.; PARANJPE, A.; ATT, W.; AITA, H.; KEWETT, A.; et al. N-acetyl cysteine (NAC)-assisted detoxification of PMMA resin. **Journal of Dental Research**, v. 87, p. 372–7, 2008

- 115- BAUME, L.; HOLZ, J. Long-term clinical assessment of direct pulp capping. **International Dental Journal**, v. 31, n. 4, p. 251–260, 1981.
- 116- HANDELMAN, S.; WASHBURN, F.; WOPPERER, P. Two-year report of sealant effect on bacteria in dental caries. **Journal of the American Dental Association**, v. 93, p. 967–970, 1976.
- 117- BESIC, F. The fate of bacteria sealed in dental cavities. **Journal of Dental Research**, v. 22, n. 5, p. 349-54, 1943.
- 118- RIBEIRO, C.; BARATIERI, L.; PERDIGÃO, J.; BARATIERI, N.; RITTER, A. A clinical, radiographic, and scanning electron microscopic evaluation of adhesive restorations on carious dentin in primary teeth. **Quintessence International**, v. 30, n. 9, p. 591–9, 1999.

ANEXO A: CARTA DE APROVAÇÃO DA CEUA



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA DO USO DE ANIMAL

CARTA DE APROVAÇÃO

Processo CEUA – 045/2017

Protocolo UEPG – 18516/2017

Título – “Autorização para utilização de 50 ratos Wistar fêmeas – *Rattus norvegicus albinus* para o projeto de tese de doutorado de Mariane Aparecida Savi Sanson (PPG Odontologia) – Padronização e validação do método de fluxometria por Laser-Doppler para avaliação de vitalidade pulpar em ratos”

Interessado: Michel Fleith Otuki (michelotuki@yahoo.com.br)

Data de Entrada – 16/10/2017

Resultado: Aprovado

Data/Prazo – 27/10/2017 a 27/10/2019

Considerações

Professor Michel Fleith Otuki (DEODONTO):

Em relação a utilização de animais no protocolo de pesquisa sob sua responsabilidade, a CEUA deliberou pela aprovação da autorizada a utilização de 50 ratos Wistar fêmeas – *Rattus norvegicus albinus*, de 8 a 9 semanas, pesando 150 a 200 gramas.

Ponta Grossa, 27 de outubro de 2017

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação

CEUA - Comissão de Estudos e Pesquisas em Animais

Dra. Dionizia Xavier Scarpini
Coordenadora

Av. Gen. Carlos Cavalcanti, nº 4748, CEP 84.030-900 Campus Universitário em Uvaranas
Ponta Grossa – Paraná
Bloco da Reitoria - anexo a PROPESP
Fone: (042) 3220-3264