

*Cláudia Huck*

**EFEITO CITOTÓXICO  
TRANSDEMENTINÁRIO DO PERÓXIDO  
DE HIDROGÊNIO EM DIFERENTES  
CONCENTRAÇÕES SOBRE CÉLULAS  
DE LINHAGEM ODONTOBLÁSTICA  
MDPC-23**

**ARARAQUARA**

**2005**

***Cláudia Huck***

**EFEITO CITOTÓXICO TRANSDENTINÁRIO DO  
PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO EM DIFERENTES  
CONCENTRAÇÕES SOBRE CÉLULAS DE  
LINHAGEM ODONTOBLÁSTICA MDPC-23**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação  
em Odontologia – Área de Dentística Restauradora da  
Faculdade de Odontologia de Araraquara, da  
Universidade Estadual Paulista, para obtenção do Título  
de Mestre.

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

**Araraquara**

**2005**

*Cláudia Huck*

**EFEITO CITOTÓXICO TRANSDENTINÁRIO DO  
PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO EM DIFERENTES  
CONCENTRAÇÕES SOBRE CÉLULAS DE  
LINHAGEM ODONTOBLÁSTICA MDPC-23**

**COMISSÃO JULGADORA**

**DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE**

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

Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP.

**1º Examinador:** Prof. Dr. Marcelo Ferrarezi de Andrade.

Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP.

**2º Examinador:** Prof. Dr. José Carlos Pereira.

Faculdade de Odontologia de Bauru – USP.

## **DADOS CURRICULARES**

**CLÁUDIA HUCK**

NASCIMENTO 20.07.66 – Artur Nogueira/ S.P.

FILIAÇÃO João Milton Huck  
Benedita Arinda Botechia Huck

1987/1990 Curso de Graduação em Odontologia na Universidade de Taubaté- UNITAU.

1994/1997 Curso de Especialização em Homeopatia no Instituto Brasileiro de Estudos Homeopáticos – IBEHE/ UNAERP.

2000/2001 Curso de Especialização em Dentística Restauradora na Fundação Araraquarense de Ensino e Pesquisa (FAEPO)- Faculdade de Odontologia de Araraquara- UNESP.

2003/2005 Curso de Pós-Graduação em Dentística Restauradora, nível de Mestrado, na Faculdade de Odontologia de Araraquara- UNESP.

**“Tudo o que o homem é capaz de imaginar é possível”**

**Max Janssen.**

## **Dedicatória**

**Aos meus pais,**

pelo amor, dedicação, compreensão e sacrifícios dispensados para que eu chegasse até aqui;

**À minha irmã Mírian,**

pelo carinho, incentivo e confiança que sempre depositou em mim;

**Ao meu irmão Wagner,**

pelo que representa para mim.

**Aos meus amigos Max e Mirjan,**

por terem me trazido de volta à vida.

## **Agradecimentos Especiais**

Ao meu melhor amigo, **Deus**.

Ao querido Orientador **Prof. Dr. Carlos Alberto de Souza Costa**, pela dedicação e confiança depositada em mim. Um exemplo de sabedoria, honestidade e humanidade que marcou para sempre a minha vida.

Ao **Prof. Dr. Edson Alves de Campos**, por estar sempre do meu lado, auxiliando, incentivando, me indicando o caminho e principalmente me mostrando que quem encontrou um amigo verdadeiro encontrou um tesouro.



Ao **Prof. Dr. Marcelo Ferrarezi de Andrade**, que sempre acreditou em minha capacidade e me deu a liberdade de aprender em outras fontes.

À **Prof. Dra. Josimeri Hebling**, pela gentileza e prestatividade que me dispensou durante a análise estatística empregada neste trabalho.

Ao meu amigo **André Afif Elossais**, amigo de todas as horas, pelo incentivo, ajuda e companheirismo.

Ao amigo **Pedro Paulo Chavez de Souza** e à todos os amigos do laboratório de Patologia e Fisiologia (Sabrina, Mariana, Célia, Andreza, Glória, Daniela, Betinho, Giovane, Kina, Adriano, Júnia) pela ajuda, companheirismo e conhecimentos transmitidos.

Aos **amigos de pós-graduação** pela amizade e convivência alegre.

Ao amigo **Renê Moreno**, pelo incentivo e carinho.

Às minhas amigas **Alcione e Elisângela**, que mesmo à distância, me apoiaram nos momentos mais difíceis.

Aos amigos **Valter Hereman e Viviane Hebling**, que em apenas um dia conquistaram a minha eterna gratidão e amizade.

## **Agradecimentos**

O desenvolvimento deste trabalho envolveu a colaboração de inúmeras pessoas e instituições, a todos o meu profundo reconhecimento:

À Faculdade de Odontologia de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista – UNESP, representada pela **Profa. Dra. Rosemary Adriana Chierici Marcantonio** (Diretora) e pelo **Prof. Dr. José Cláudio Martins Segalla** (Vice-Diretor).

Aos **Professores da Disciplina de Dentística Restauradora** da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP - **Prof. Dr. José Roberto Cury Saad** (Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Dentística Restauradora), **Prof. Dr. Marcelo Ferrarezi de Andrade**, **Profa. Dra. Maria Salete Machado Candido**, **Prof. Dr. Welington Dinelli**, **Prof. Dr. Osmir Batista de Oliveira Junior**, **Prof. Dr. Sillas Luis Lordello Duarte Junior** e **Prof. Dr. Sizenando de Toledo Porto Neto**, pelos ensinamentos transmitidos, amizade e oportunidades que me foram concedidas durante esses anos de convivência.

Aos funcionários da disciplina de Dentística Restauradora: **Cleusa, Adriana, Cida, D. Cida, Cláudio, Marinho, Conceição**, pela amizade e dedicação.

Aos Funcionários da Seção de Pós-Graduação: **Mara, Silvinha, Rosângela e Vera**, pela cordialidade e prestatividade.

Aos funcionários da Biblioteca: **Maria Helena, Maria Inês, Silvia, Eliana, Adriano, Odete e Marley**, pela ajuda e solidariedade.

À todos os **Professores e Funcionários** da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP.

Ao **Prof. Dr. Ricardo Marins de Carvalho** e ao Departamento de Dentística Restauradora da Faculdade de Odontologia de Bauru, pelo auxílio no desenvolvimento do dispositivo para teste de condutância hidráulica dental.

À **Profa. Andrea Salmazo Posi**, pela colaboração e supervisão no desenvolvimento matemático do teste de condutância hidráulica.

À **DMC Equipamentos LTDA**, pela colaboração e patrocínio à esta pesquisa.

Aos **Srs. Renaldo Massini Jr., Oswaldo Amauri Erlo e Marcos Aurélio Napolitano**, pela colaboração, confiança e prestatividade.

Aos amigos **Rogério Bortolosso, Edson Salviano, Célia e Paraná**, pela colaboração no desenvolvimento do dispositivo utilizado nesta pesquisa.

À **Prof. Dra. Mariza** pela ajuda no teste de espectrofotometria.

À **Allan Neuman** pela colaboração na computação gráfica deste trabalho.

Ao **Prof. Elliot W. K. Kitajima, Paulo e Renato (ESALQ/USP)** pelo auxílio na microscopia eletrônica de varredura.

À **EMBRAMED**, pela colaboração e doação de materiais para instalação do dispositivo para teste de condutância hidráulica dental.

À todos que direta e indiretamente tornaram este trabalho possível,

**o meu eterno reconhecimento.**

## SUMÁRIO

|                                                            |     |
|------------------------------------------------------------|-----|
| 1. Introdução.....                                         | 15  |
| 2. Revisão da literatura.....                              | 25  |
| 2.1. Permeabilidade Dentinária.....                        | 25  |
| 2.2. Citotoxicidade.....                                   | 49  |
| 3. Proposição.....                                         | 76  |
| 4. Material e método.....                                  | 78  |
| 4.1. Obtenção dos espécimes.....                           | 78  |
| 4.2. Condutância hidráulica.....                           | 82  |
| 4.2.1. Cálculo da condutância hidráulica.....              | 85  |
| 4.3. Dispositivo porta-disco de dentina.....               | 88  |
| 4.4. Manutenção das células MDPC-23 em cultura.....        | 91  |
| 4.5. Agente clareador.....                                 | 94  |
| 4.6. Análise da viabilidade celular.....                   | 98  |
| 4.7. Análise da morfologia celular e da dentina (MEV)..... | 100 |
| 5. Resultado.....                                          | 103 |
| 5.1. Análise estatística da permeabilidade dentinária..... | 103 |
| 5.2. Análise estatística do metabolismo celular.....       | 104 |
| 5.3. Análise da morfologia celular e da dentina (MEV)..... | 108 |
| 6. Discussão.....                                          | 116 |
| 7. Conclusão.....                                          | 139 |
| 8. Referências.....                                        | 141 |
| 9. Anexos.....                                             | 154 |
| 10. Resumo.....                                            | 163 |
| 11. Abstract.....                                          | 166 |

# Introdução

---

## 1 Introdução

O clareamento dental tem sido usado há mais de cem anos (DWINELLE<sup>20</sup>, 1850), sendo que desde então, variadas técnicas e componentes químicos têm sido utilizados com o objetivo de clarear o elemento dentário. Os primeiros métodos de clareamento dental utilizavam como agentes químicos ativos o cloreto de cálcio e soda (DWINELLE<sup>20</sup>, 1850), ácido acético, cianeto de potássio e ácido sulfúrico (FITCH<sup>23</sup>, 1861). Além destes, muitos outros métodos associados a diferentes componentes químicos foram empregados na odontologia, sendo que alguns agentes químicos não foram recomendados por apresentarem características venenosas ou mesmo causarem efeitos altamente tóxicos para os pacientes (BARKER<sup>6</sup>, 1861). Naquela época, o clareamento dental era realizado em consultório odontológico em dentes sem vitalidade pulpar (LATIMER<sup>41</sup>, 1868). O primeiro relato de clareamento em dentes com vitalidade pulpar foi em 1868, realizado por Latimer<sup>41</sup>, onde utilizou ácido oxálico.

O peróxido de hidrogênio foi introduzido como solução desinfetante e irrigadora dental por Harlan<sup>33</sup> no ano de 1884, o qual sugeriu que esta substância também poderia ser utilizada como agente clareador de dentes escurecidos. A partir daí, o clareamento de dentes com vitalidade pulpar utilizando o peróxido de hidrogênio começou efetivamente a ser realizado (AMES<sup>2</sup>, 1937; FISHER<sup>22</sup>, 1911; KIRK<sup>39</sup>, 1889; PRINZ<sup>53</sup>, 1924). O clareamento dental realizado em consultório odontológico geralmente utilizava compressas de algodão embebidas

em solução de peróxido de hidrogênio 30% associado à instrumentos aquecidos, os quais aceleravam o processo de reação química do material sobre a estrutura dentária. Desde então, o peróxido de hidrogênio tem sido o princípio ativo na maioria dos agentes clareadores, e muitas técnicas têm sido desenvolvidas associando o peróxido de hidrogênio a outras substâncias ou métodos com a finalidade de potencializar seus efeitos (AMES<sup>2</sup>, 1937; FISHER<sup>22</sup>, 1911; PRINZ<sup>53</sup>, 1924).

Atualmente, existem duas principais técnicas de clareamento para dentes com vitalidade pulpar: a técnica de consultório e a técnica de clareamento caseiro supervisionada (HAYWOOD e HEYMANN<sup>36</sup>, 1989).

Os agentes clareadores usados em consultório odontológico se apresentam como altas concentrações de peróxido de hidrogênio disponíveis na forma de solução, pasta ou gel. Tem sido descrito que o peróxido de hidrogênio na concentração de 35% é o mais utilizado para clareamento dental (GOLSTEIN<sup>27</sup>, 1997). Esta técnica geralmente utiliza uma fonte de calor ou luz para acelerar o processo de reação do peróxido de hidrogênio (GOKAY<sup>26</sup>, 2000).

A técnica de clareamento caseiro foi introduzida por Haywood e Heymann<sup>36</sup> em 1989 e consiste da utilização de agentes clareadores à base de peróxido de carbamida em concentrações mais baixas que os agentes de uso em consultório (10% a 16%) ou peróxido de hidrogênio (1,5% a 7,5%). Estes agentes químicos são utilizados pelos pacientes em aplicações diárias de 1 a 8 horas com moldeira personalizada, por períodos que podem variar de 2 a 4 semanas (HAYWOOD<sup>35</sup>, 1989). Geralmente, o agente clareador é o peróxido de



hidrogênio ou produtos que se desdobram em peróxido de hidrogênio, tal como o peróxido de carbamida 10% que se decompõe em uréia a 6,4% e peróxido de hidrogênio a 3,6%. O peróxido de hidrogênio dissocia-se em água e oxigênio, e a uréia, por sua vez, decompõe-se em dióxido de carbono e amônia (FEINMAN et al.<sup>21</sup>, 1987).

O clareamento dental caseiro, apesar de caracterizar uma modalidade de tratamento mais lenta do que aquela realizada em consultório, tem sido amplamente empregado, principalmente pela sua praticidade e baixo custo. No entanto, atualmente há uma tendência para clareamentos dentais mais rápidos, os denominados “Power Bleaching”, realizados em consultório odontológico, através da aplicação de agentes clareadores em altas concentrações, onde muitas vezes, em uma única sessão o paciente alcança os resultados esperados (GARBER<sup>25</sup>, 1997).

Um dos mais recentes avanços na área de clareamento dental realizado em consultório é a técnica da dupla ativação, onde os agentes químicos clareadores podem ser ativados tanto química como fisicamente, através da aplicação de uma fonte de luz. Os agentes clareadores de ativação dual apresentam, em sua composição, a associação de agentes espessantes, pigmentos e catalizadores físicos e químicos. Estes produtos, geralmente contém caroteno em sua composição, o qual, quando ativado por uma fonte de luz azul visível ou *laser*, converte a energia luminosa em calor, acelerando o processo da reação química dos agentes clareadores (GARBER<sup>25</sup>, 1997).

Os mecanismos exatos do clareamento dental ainda não estão totalmente

esclarecidos. A natureza química óxido-redutora dos agentes clareadores pode ser usada como base teórica no entendimento da dinâmica do processo de clareamento (KAWAMOTO e TSUJIMOTO<sup>38</sup>, 2004; LI<sup>43</sup>, 1996).

Todos os agentes clareadores dentais, desde o peróxido de carbamida até o peróxido de hidrogênio, sofrem ionização e decomposição, produzindo radicais livres, os quais são altamente instáveis e apresentam notável capacidade de reagir com outras substâncias orgânicas (KAWAMOTO e TSUJIMOTO<sup>38</sup>, 2004; LI<sup>43</sup>, 1996). A base da habilidade clareadora está no fato de que quando esses agentes reagem com moléculas orgânicas altamente conjugadas, eles rompem a conjugação do elétron e alteram a absorção de energia da molécula, levando à alteração na sua estrutura óptica (SEGHI e DENRY<sup>57</sup>, 1992; SUN<sup>61</sup>, 1998). Isto pode resultar no deslocamento do espectro de absorção do composto, transformando o composto com longo comprimento de onda (escuro) em outro com comprimento de onda mais curto e, portanto, mais claro (SEGHI e DENRY<sup>57</sup>, 1992; SUN<sup>61</sup>, 1998).

No entanto, as reações de radicais livres não são específicas apenas para moléculas pigmentadas dos dentes, podendo também, reagir potencialmente com outras estruturas orgânicas (KAWAMOTO e TSUJIMOTO<sup>38</sup>, 2004). As espécies de oxigênio reativos são conhecidas como promotoras de injúrias às células vivas devido ao estresse oxidativo que promovem (FLOYD<sup>24</sup>, 1997; KAWAMOTO e TSUJIMOTO<sup>38</sup>, 2004; LI<sup>43</sup>, 1996). Os estresses oxidativos podem causar apoptose, danos ao DNA (genotoxicidade) e citotoxicidade celular (FLOYD<sup>24</sup>, 1997; KANNO et al.<sup>37</sup>, 2003; LI<sup>43</sup>, 1996). Portanto, possíveis alterações causadas

por uso indiscriminado de agentes clareadores podem potencialmente ocorrer em todos os tecidos dentais (POCTONIK et al.<sup>52</sup>, 2000; TITLEY et al.<sup>64</sup>, 1988).

A polpa dental é um tecido conjuntivo que apresenta íntimo relacionamento funcional e embriológico com a dentina. Por serem considerados indissociáveis, dentina e polpa deixaram de ser caracterizados como estruturas isoladas e desde então, passaram a se organizar numa estrutura única, denominada de complexo dentino-pulpar (SUDA e IKEDA<sup>59</sup>, 2002). Além disso, células da polpa podem responder às situações clínicas que causam injúrias ou perda da integridade dos tecidos duros dentais (SUDA e IKEDA<sup>59</sup>, 2002).

As respostas inflamatórias iniciais nos tecidos geralmente resultam em aumento localizado do fluxo sanguíneo e aumento da pressão intersticial, facilitando a remoção dos mediadores inflamatórios e substâncias irritantes (TONDER e KVINNSLAND<sup>65</sup>, 1983). Dependendo da intensidade da resposta inflamatória, pode ocorrer aumento do volume do tecido com conseqüente elevação da pressão pulpar interna, e isto pode resultar em sérios danos para este tecido conjuntivo especializado, o qual está confinado dentro de um compartimento de tecido mineralizado sem capacidade de se expandir (SUDA e IKEDA<sup>59</sup>, 2002; TONDER e KVINNSLAND<sup>65</sup>, 1983). Assim, os efeitos citotóxicos de agentes químicos associados a sua capacidade de desencadear resposta inflamatória significativa na polpa, pode resultar em sérios danos a este tecido, o qual é responsável pela manutenção da dentina e apresenta notável capacidade de reparação quando submetido à agressão de variada origem. Conseqüentemente, materiais dentários ou substâncias químicas tóxicas, que

apresentam capacidade de difusão através dos túbulos dentinários para alcançar o tecido pulpar, podem causar danos irreversíveis à polpa ou mesmo induzir a um processo de morte e necrose tecidual. Este fato pode fazer com que determinados materiais e substâncias químicas ou mesmo alguns procedimentos clínicos sejam contra-indicados (COSTA et al.<sup>17</sup>, 2000).

O procedimento de clarear o elemento dental é possível devido à permeabilidade da estrutura dental aos agentes clareadores (ARWILL et al.<sup>5</sup>, 1969; HANKS et al.<sup>30</sup>, 1993; PASHLEY<sup>49</sup>, 1988) e ao baixo peso molecular de alguns componentes químicos ativos, tal como o peróxido de hidrogênio (ARWILL et al.<sup>5</sup>; LI<sup>43</sup>, 1996). Estes dois fatores isoladamente, ou em conjunto, parecem facilitar a livre difusão dos agentes clareadores pelos tecidos dentais. Alguns autores mostraram que o peróxido de hidrogênio, mesmo em baixas concentrações, penetra muito facilmente no esmalte e se difunde em profundidade na dentina para alcançar a polpa dental (BOWLES e THOMPSON<sup>10</sup>, 1986; BOWLES e UGWENERI<sup>11</sup>, 1987; COHEN e CHASE<sup>12</sup>, 1979; COOPER e SOKMEYER<sup>13</sup>, 1992; GOKAY<sup>26</sup>, 2000; HANKS<sup>30</sup>, 1993; THITINANTHAPAN et al.<sup>63</sup>, 1999). Além disso, a difusão do peróxido de hidrogênio pelos tecidos dentais pode ser quantitativamente aumentada pelo contato do agente clareador com a dentina exposta em áreas de recessões gengivais, abrasões, erosões, desgastes, defeitos no esmalte, defeitos na junção cimento-esmalte, ou em áreas marginais entre o dente e a restauração (COHEN e CHASE<sup>12</sup>, 1979; GOKAY<sup>26</sup>, 2000; HANKS<sup>30</sup>, 1993). Recentemente, foi relatado que os maiores níveis de peróxido de hidrogênio na câmara pulpar foram encontrados em dentes que

apresentavam restaurações e quando o peróxido de hidrogênio foi usado em altas concentrações (BENETTI<sup>8</sup>, 2004; GOKAY<sup>26</sup>, 2000). Este fato parece tornar possível a ocorrência de efeitos tóxicos e adversos do peróxido de hidrogênio quando este agente químico é empregado em procedimentos clareadores inadequados, abusivos ou quando há situações de acidentes não intencionais.

Todos os materiais ou agentes químicos desenvolvidos para aplicação na área odontológica ou médica, antes de serem introduzidos no mercado, devem ser submetidos à testes preliminares de citotoxicidade e biocompatibilidade, os quais avaliam as propriedades biológicas e os fatores de risco. Especificamente para a área odontológica, a avaliação completa de um material dentário necessita, de acordo com a ANSI, ADA, ISO e FDI, passar por uma seqüência de testes, os quais estão divididos em três categorias: testes iniciais, testes secundários e testes de aplicação clínica (pré-clínicos) (SMITH<sup>58</sup>, 1982). Os testes iniciais são realizados com a intenção de determinar os efeitos tóxicos de um material e inclui vários métodos, como por exemplo, o teste em cultura de células. Este teste, o qual é facilmente reproduzido, de desenvolvimento rápido e de custo relativamente baixo, determina de maneira preliminar o possível efeito citopático de um determinado material experimental ou de seus componentes isolados.

Por definição, citotoxicidade de um agente significa o efeito destrutivo que este agente provoca às células (LI<sup>43</sup>, 1996). A interação dos materiais e seus componentes com as células em nível molecular é responsável por grande parte das reações teciduais, tais como inflamação, necrose, alterações imunológicas, mutagênicas e carcinogênicas. Além disso, os testes de citotoxicidade em cultura

de células podem avaliar os efeitos provocados por um determinado agente nas alterações metabólicas, crescimento das células, alterações na permeabilidade da membrana e citopatogenéticas. Desta maneira, testes iniciais foram recomendados e standardizados por importantes Organizações, Federações e Associações internacionais, e se caracterizam, até os dias de hoje, como métodos essenciais para se avaliar a toxicidade de um material ou técnica odontológica nova (SMITH<sup>58</sup>, 1982).

Até o momento, poucos estudos *in vivo* têm relatado os efeitos citotóxicos dos agentes clareadores sobre células da polpa (ANDERSON<sup>3</sup>, 1999; BAUMGARTNER et al.<sup>7</sup>, 1983; BOWLES e BURNS<sup>9</sup>, 1992; BOWLES e THOMPSON<sup>10</sup>, 1986; COHEN e CHASE<sup>12</sup>, 1979; ROBERTSON E MELFI<sup>54</sup>, 1980; SEALE et al.<sup>56</sup>, 1981). Apenas algumas pesquisas (AREN<sup>4</sup>, 2003; HANKS et al.<sup>30</sup>, 1993; KANNO et al.<sup>37</sup>, 2003; KOULAOUZIDOU et al.<sup>40</sup>, 1998; WOOLVERTON et al.<sup>68</sup>, 1993) realizadas *in vitro* avaliaram os efeitos do peróxido de hidrogênio diretamente sobre fibroblastos de ratos em cultura. Todavia, não há relato de estudos *in vitro* de citotoxicidade do peróxido de hidrogênio sobre cultura de células de origem odontoblástica. A realização de pesquisas com esta linhagem celular seria importante, uma vez que os odontoblastos são as primeiras células que entram em contato com as substâncias que por difusão ultrapassam o esmalte e dentina para alcançar a câmara pulpar (COSTA et al.<sup>18</sup>, 1999). Também, a interação de uma substância com os variados componentes da estrutura dentinária podem produzir diferentes respostas sobre o tecido pulpar (ABOU HASHIEH et al.<sup>1</sup>, 1998; PASHLEY<sup>49</sup>, 1988). Desta

maneira, a dentina pode ser considerada como uma importante barreira para a difusão de substâncias em direção à polpa dental. Neste ponto, os testes de citotoxicidade *in vitro* que incluem barreira dentinária, parecem se aproximar das condições clínicas (PASHLEY<sup>49</sup>, 1988). Estes testes devem ser incrementados para que se possa obter, através de pesquisas *in vitro*, dados científicos relevantes, os quais possam contribuir diretamente com o desenvolvimento de novos materiais e técnicas, assim como evitar a ocorrência de danos ao complexo dentino-pulpar quando da utilização de materiais tóxicos ou novos procedimentos clínicos agressivos.

# **Revisão da Literatura**





## **2 Revisão da Literatura**

### **2.1 Dentina e Permeabilidade**

Um estudo conduzido por Arwill et al.<sup>5</sup>, 1969, teve como objetivo determinar a capacidade de certas substâncias em alterar a fase orgânica do dente e influenciar a taxa de penetração do  $^{22}\text{Na}$  através do esmalte e dentina. Foram testadas cinco diferentes soluções com diferentes pesos moleculares: uréia (peso molecular = 60); peróxido de hidrogênio (peso molecular = 34); clorofórmio (peso molecular = 119); papaína (peso molecular = 27.000) e extrato aquoso de cacau (peso molecular = 10.000). Os autores utilizaram 24 pares de pré-molares humanos íntegros extraídos por motivos ortodônticos, onde cada par foi utilizado de maneira que um dos dentes foi exposto por seis horas à substância, enquanto o seu homólogo serviu de controle. Os testes de permeabilidade foram realizados através de um detector de radioisótopos. Os resultados mostraram que a taxa de penetração do  $^{22}\text{Na}$  através das coroas dentais expostas à uréia foi aproximadamente o dobro da taxa dos dentes contra-laterais utilizados como controle. As coroas expostas ao peróxido de hidrogênio mostraram um aumento de 2 a 4 vezes na taxa de penetração em comparação ao grupo controle. As coroas expostas ao clorofórmio, à papaína e ao extrato de cacau não mostraram efeitos sobre a taxa de penetração do  $^{22}\text{Na}$  através do esmalte e dentina. Os autores sugeriram que a possível explicação para tais diferenças sobre a taxa de penetração do  $^{22}\text{Na}$  seria a diferença no peso molecular, onde substâncias com

baixo peso molecular, tais como a uréia e o peróxido de hidrogênio, poderiam se difundir mais facilmente pelas estruturas dentais. Outra possível explicação seria a de que uma destruição da matriz protéica poderia permitir uma maior passagem do  $^{22}\text{Na}$  através do esmalte e dentina. Já o clorofórmio apesar de ter baixo peso molecular não causou nenhuma alteração na difusão. Os autores argumentaram que por ser o clorofórmio um solvente de lipídeos, este resultado pode ser devido ao fato de se ter uma baixa concentração de lipídeos na estrutura do esmalte e dentina, e que provavelmente, os lipídeos não interferem na movimentação de íons.

Outhwaite et al.<sup>47</sup>, 1976, avaliaram as variações na permeabilidade da dentina humana ocorridas em função das alterações na área de superfície, espessura, temperatura e tempo pós-extração. Os autores utilizaram discos de dentina obtidos de terceiros molares humanos extraídos livres de esmalte e cornos pulpares, que foram posicionados em um dispositivo simulando uma câmara repartida em dois compartimentos que permitia a colocação de um agente rastreador ( $\text{Na } ^{125}\text{I}$ ) de um dos lados do dispositivo e a contínua lavagem e coleta deste agente do outro lado do disco no dispositivo. Foram usados pares de anéis de borracha de diferentes diâmetros com a finalidade de delimitar diferentes áreas da dentina para difusão: 0,071; 0,126; 0,221 e 0,292  $\text{cm}^2$ . A duplicação da área de superfície da dentina causou uma aproximada duplicação na taxa de permeabilidade pelo  $^{125}\text{I}$ . Para a variação na temperatura foram utilizados cinco discos de dentina e trinta e três medições em diferentes temperaturas. Os

resultados mostraram que um aumento na temperatura de 25 para 35° C, ou seja, um aumento de 10° C quase duplicou a permeabilidade ao  $^{125}\text{I}$ . Quanto mais próximo à câmara pulpar se localizou a dentina maior foi a permeabilidade. As reduções da espessura dentinária feitas do lado pulpar ou de fundo resultaram em baixa taxa de aumento de permeabilidade. Porém, as reduções na espessura dos discos de dentina realizadas apenas no lado oclusal, ou seja, do lado do esmalte ou topo aumentaram a permeabilidade dentinária. Os autores explicam que isto se deve à maior quantidade de matriz dentinária intertubular calcificada próxima à junção amelo-dentinária, e também a área de superfície dos túbulos dentinários avaliados para difusão por unidade de área é menor na junção e maior próximo à polpa. Outro fator seria devido ao decréscimo progressivo do diâmetro tubular na direção da polpa para o esmalte, contribuindo desta forma para o aumento da permeabilidade quanto mais próximo da polpa estiver o disco de dentina. A permeabilidade dental não foi significativamente alterada pelo tempo pós-extração. Houve um discreto aumento na permeabilidade entre a primeira hora e o primeiro e segundo dias após a extração e nenhuma alteração na permeabilidade foi detectada entre os períodos de três a quatro semanas.

Com a finalidade de medir a quantidade de peróxido de hidrogênio que ultrapassa as estruturas dentais e atinge a polpa durante o procedimento de clareamento dental, Bowles e Ugweneri<sup>11</sup>, 1987, realizaram um estudo *in vitro* onde utilizaram dentes humanos extraídos (anteriores superiores) que foram cortados em aproximadamente 3 mm para apical da junção cimento-esmalte. O

tecido pulpar foi removido e a câmara pulpar foi preenchida com uma solução tamponada. A superfície vestibular dos dentes foi exposta às soluções de peróxido de hidrogênio por um tempo de 15 minutos a 37° C. Foram usadas três concentrações de peróxido de hidrogênio : 1% (7 dentes), 10% (8 dentes) e 30% (11 dentes). Oito dentes (grupo controle) não receberam nenhum tipo de exposição ao peróxido de hidrogênio, mas foram submetidos às idênticas condições dos outros grupos, com exposição apenas à água destilada. Um outro experimento foi conduzido variando apenas a temperatura, para tanto utilizaram dois grupos de 12 dentes cada, que foram expostos ao peróxido de hidrogênio 10%, um grupo à 37° C e o outro à 50° C. No final de cada experimento, a solução contida dentro da câmara pulpar foi removida e preparada para análise em espectrofotômetro, com leitura da absorbância a 596 nm. Os resultados mostraram que a quantidade de peróxido de hidrogênio dentro da câmara pulpar aumentou com a elevação na concentração do peróxido de hidrogênio, onde para 1%, 10% e 30% os números foram de 1,8 µg; 5,8 µg e 25,4 µg respectivamente. Já para os dois grupos que receberam exposição ao peróxido de hidrogênio 10% por 15 minutos em diferentes temperaturas o resultado evidenciou um aumento significativo na quantidade de peróxido de hidrogênio que se difundiu para dentro da câmara pulpar com a elevação da temperatura, sendo de 9,3 µg à 37° C e 25,5 µg à 50° C. Os autores reconhecem que apesar deste estudo *in vitro* ser representativo do processo *in vivo*, os resultados mostraram que peróxido de hidrogênio realmente penetra os tecidos duros dentais e atinge a câmara pulpar mesmo em baixas concentrações.

Pashley et al.<sup>50</sup>, 1987, determinou qualitativa e quantitativamente a permeabilidade da dentina humana *in vitro*. Os autores utilizaram segmentos de coroa e discos de dentina obtidos de terceiros molares humanos extraídos. Os espécimes foram submetidos a testes de condutância hidráulica. Os dois tipos de preparação demonstraram variações regionais na permeabilidade, com maiores valores na região periférica e menores na região central da coroa ou do disco de dentina. Esta variação deve ser levada em conta pelos pesquisadores, que podem compensar esta variação utilizando uma maior área dos espécimes em testes laboratoriais.

Aboul Hashieh et al.<sup>1</sup>, 1998, chamaram a atenção para o fato de que a espessura da dentina remanescente deve ser levada em conta durante os testes de citotoxicidade dos materiais que utilizam barreira dentinária, uma vez que a permeabilidade varia muito de um dente para outro. Ressaltaram que os protocolos experimentais para testes *in vitro* devem levar em conta estas variações na permeabilidade, de forma a produzirem teste com maior confiabilidade. Para tanto, desenvolveram um estudo onde determinaram a influência da permeabilidade da dentina em um teste citotoxicidade, mostrando que diferentes permeabilidades podem produzir diferentes respostas nestes testes. Os autores usaram 36 discos de dentina com 0,5 mm de espessura obtidos de terceiros molares humanos hígidos que foram divididos em dois grupos: alta e baixa condutância hidráulica (permeabilidade). A condutância hidráulica foi determinada através de um dispositivo (Flodec, De Marco Engineering, Geneve,

Switzerland) que mede o volume de fluido forçado através de um disco de dentina sob pressão hidrostática por unidade de área, por unidade de tempo e por unidade de pressão. Quatro agentes adesivos com semelhante citotoxicidade foram testados em cada grupo. Os testes foram realizados em dispositivos que simularam uma câmara pulpar “*in vitro pulp chamber*” ou câmara de filtração, onde cada disco de dentina foi posicionado de forma que o lado pulpar ficou em contato com o meio de cultura no interior da câmara e o lado oclusal do disco ficou em contato com o meio ambiente e foi submetido aos adesivos dentinários. Cada disco de dentina foi utilizado previamente como seu próprio grupo controle, onde permaneceu por 24 horas em contato com o meio de cultura sem nenhum tratamento da dentina com agentes adesivos. Após 24 horas este meio de cultura foi removido e substituído por um novo meio que agora seria do grupo experimental, ou seja, com o tratamento da dentina com os agentes adesivos. Após 24 horas de incubação, o meio de cultura que ficou em contato com o lado pulpar do disco de dentina tratado com agente adesivo foi removido e foi utilizado no teste de citotoxicidade em fibroblastos (L 929 fibroblasts - NCTC CCLI, Flow Laboratories, Paisley, UK) semeados em placas com 96 “wells”. Os fibroblastos permaneceram em contato com o meio experimental por um período de incubação de 24 horas. Depois deste tempo, o meio foi removido e o teste de MTT foi realizado. O meio de cultura experimental foi testado em quatro diluições: 1:2, 1:10, 1:100 e não diluído. O grupo com discos de dentina com alta condutância hidráulica apresentou maior citotoxicidade do que o grupo com baixa condutância hidráulica quando testado no meio de cultura não diluído. Nenhuma diferença na

citotoxicidade foi obtida nas diluições 1:2, 1:10 e 1:100. Desta forma, os autores concluíram que agentes adesivos dentinários resinosos são mais citotóxicos quando aplicados em dentina com alta condutância hidráulica.

Wang e Hume<sup>66</sup>, 1988, determinaram *in vitro* a difusão dos íons hidrogênio ( $H^+$ ) e hidroxilas ( $OH^-$ ) de vários ácidos e álcalis através da dentina humana. A difusão dos íons hidrogênio  $H^+$  originários de ácidos inorgânicos fortes ocorreu muito lentamente ou não ocorreu totalmente em períodos de observação superiores a 16 dias. Nestes mesmos dentes houve uma rápida difusão de água marcada com Tritium. Os íons hidrogênio de vários ácidos fracos atravessaram a dentina muito rapidamente, assim como os íons hidroxilas  $OH^-$  provenientes de materiais alcalinos. Foi testada também a capacidade tampão da dentina e hidroxiapatita para vários ácidos e álcalis. Os autores encontraram que a dentina é um efetivo tamponador para ácidos e isto foi atribuído à capacidade tamponadora da dentina, hidroxiapatita e outros componentes. A capacidade tampão da dentina para álcalis foi menos intensa. De acordo com esses dados os autores sugeriram que os íons  $H^+$  originários de ácidos fortes penetram na dentina muito fracamente devido a efetiva remoção dos íons  $H^+$  pelas imediatas interações tamponadoras locais. Os produtos destas reações tamponadoras podem também ter contribuído para bloqueio dos túbulos após alguns dias. Por outro lado, ácidos fracos tenderam a manter sua forma não associada, e então puderam se difundir enquanto escaparam dos efeitos tamponadores da dentina. A capacidade tampão da dentina

para álcalis pareceu ser mais limitada e desta forma se mostrou mais permeável, permitindo a difusão dos íons  $\text{OH}^-$ .

Titely et al.<sup>64</sup>, 1988, analisaram através de MEV os efeitos produzidos pelo peróxido de hidrogênio 35% e ácido fosfórico 37%, usados em combinação ou não, sobre a dentina humana. Os autores utilizaram discos de dentina com 1mm de espessura obtidos de pré-molares humanos extraído. Cada disco foi dividido em 4 corpos de prova, num total de 28 corpos de prova, sendo 14 para os grupos experimentais e 14 para o grupo controle. O peróxido de hidrogênio foi testado por períodos de 1; 3; 5; 10; 20; 30; ou 60 minutos, sendo que dois corpos de prova foram utilizados para cada tempo. O ácido fosfórico foi utilizado no tempo fixo de 60 segundos. Os experimentos foram divididos em três diferentes grupos: 1-) os corpos de prova foram imersos em peróxido de hidrogênio 35% ou solução salina (controle) nos períodos de tempo designados; 2-) os corpos de prova foram imersos em peróxido de hidrogênio ou solução salina (controle) nos tempos designados e depois condicionados com ácido fosfórico 37% por 60 segundos; 3-) os corpos de prova foram condicionados com ácido fosfórico por 60 segundos e depois imersos em peróxido de hidrogênio ou solução salina (controle) nos tempos designados. As análises do Grupo 1 revelaram que a *smear layer* sobre a superfície da dentina cortada não foi removida pela aplicação do peróxido de hidrogênio sozinho, e que um denso precipitado amorfo foi formado sobre a superfície da *smear layer* após um tempo de exposição mais extenso. O aparecimento deste precipitado foi notado após 20 minutos de exposição ao



peróxido de hidrogênio, o que levou os autores a sugerirem que a formação do precipitado é tempo-dependente. Análises da dentina exposta ao peróxido de hidrogênio seguida de condicionamento ácido por 60 segundos (Grupo 2) revelou a presença de um depósito granular muito fino sobre a uma superfície dentinária limpa. Uma modesta quantidade de precipitado amorfo sobre toda a superfície da dentina pode ser visto somente após 60 minutos de exposição ao peróxido de hidrogênio. As análises dos corpos de prova que foram primeiro condicionados com ácido fosfórico 37% por 60 segundos e depois expostos ao peróxido de hidrogênio 35% (Grupo 3), indicaram que a *smear layer* foi efetivamente removida e que os orifícios dos túbulos dentinários foram alargados, possibilitando uma maior penetração do peróxido de hidrogênio. Os autores argumentaram que este fato também pode ter sido responsável pelo menor acúmulo de precipitado amorfo sobre a dentina do que os outros métodos testados. A ausência de formação de precipitado na dentina pré-tratada com ácido e depois exposta ao peróxido de hidrogênio pareceu indicar que a formação do precipitado é principalmente um produto da interação entre o peróxido e a *smear layer*.

Pashley<sup>49</sup>, 1988, em revisão de alguns dos importantes princípios que regulam a taxa em que substâncias se difundem através da dentina para a polpa, relatou que muitas substâncias se movem através da dentina por simples difusão que pode ser entendida como colisão de moléculas. A difusão varia diretamente com a temperatura e a concentração da substância. Quanto maior a concentração maior a taxa de difusão. Contudo, o peso molecular se correlaciona em proporção

inversa, ou seja, quanto menor o peso molecular maior a difusão. A espessura da dentina pode atenuar a difusão pela dissipação da concentração devido à maior distância entre a substância e a polpa dental. Em dentina remanescente muito fina a resposta inflamatória pulpar foi aumentada. O autor afirma que o desenvolvimento de alterações citotóxicas na polpa dental é em grande parte devido à permeabilidade da dentina, e que em uma dentina impermeável estas alterações poderiam não ocorrer. A permeabilidade dentinária não é uniforme, com tendência de ser baixa no terço incisal e alta nas proximidades dos cornos pulpares dos dentes posteriores. Em um disco de dentina cortado na região média da coroa, a permeabilidade é maior sobre os cornos pulpares e menor no centro deste disco. Nas imediações do limite amelo-dentinário e limite dentino-cementário a permeabilidade é muito baixa, em torno de 1%, e alta nas imediações da câmara pulpar (22%). Isto pode ser explicado pelo fato de que o diâmetro dos túbulos dentinários é maior próximo à polpa. A dentina vestibular é menos permeável do que a dentina oclusal, enquanto a permeabilidade da dentina radicular é mais baixa do que a dentina coronária. Outro fator de forte influência na permeabilidade é a presença de *smear layer*, que promove oclusão dos túbulos dentinários e diminui a permeabilidade. Para maximizar a permeabilidade dentinária em testes de citotoxicidade, a *smear layer* deve ser removida com o uso de ácidos ou EDTA 0,5 M por 1 minuto. Em outros casos, a *smear layer* pode ser mantida para simular as condições clínicas. A remoção da *smear layer* também aumenta a condutância hidráulica da dentina. Existe uma sutil, porém significativa, pressão intra-pulpar positiva *in vivo*, de aproximadamente 20 mmHg ou 15 cm de

H<sub>2</sub>O. Este gradiente de pressão tende a impulsionar o fluido lentamente da polpa através dos túbulos em direção à superfície, se opondo com a difusão das substâncias da dentina cortada em direção à polpa. A esclerose tubular e a presença de cárie também produzem grande redução na permeabilidade. A presença física da bactéria na dentina cariada restringe a difusão. Além disso, o processo de remineralização desta dentina pode resultar na criação de cristais intra-tubulares, chamados de cristais de cárie e que podem reduzir a permeabilidade. A dentina é um tecido capaz de se ligar ou seqüestrar uma variedade de substâncias que se movem através dos túbulos dentinários, como por exemplo, os íons hidrogênio e muitas proteínas tais como a albumina e o fibrinogênio, que podem provocar uma diminuição na permeabilidade dentinária por obliteração tubular. Por outro lado, a presença de odontoblastos aderidos na dentina não exerce influência significativa sobre a permeabilidade e não interfere nos testes de citotoxicidade realizados em laboratório. No entanto, a presença de odontoblastos aderidos aos orifícios dos túbulos dentinários pode simular melhor as condições *in vitro* em que estas células são expostas a agentes potencialmente tóxicos do que sistemas onde os agentes são diluídos em volume de fluido. O autor conclui que a dentina é uma importante barreira para a difusão de substâncias em direção à polpa dental, e que o desenvolvimento de métodos *in vitro* para testar a biocompatibilidade de materiais odontológicos que incluem uma barreira dentinária pode melhorar a correlação entre os resultados laboratoriais e clínicos.

Matthews e Pashley<sup>45</sup>, 1992, determinaram a influência da pressão interna pulpar sobre a difusão de substâncias advindas do meio externo para o interior da câmara pulpar. Segundo os autores a taxa de difusão de substâncias para o interior da câmara pode ser modificada se os túbulos dentinários estiverem abertos em todo o seu comprimento. Os autores utilizaram discos de dentina de 1mm de espessura e câmara de filtração para medir a permeabilidade e difusão do <sup>125</sup>I através do disco com e sem a presença de *smear layer* e com ou sem a presença de pressão interna de 15 cm de H<sub>2</sub>O. Os resultados mostraram que a presença de uma pressão fisiológica interna diminuiu a taxa de difusão do <sup>125</sup>I através do disco de dentina em 12,5% com a presença de *smear layer*, sendo que esta taxa foi de 53% quando houve ausência de *smear layer*.

Devido a grande aceitação e utilização dos agentes clareadores de uso caseiro, Cooper et al.<sup>13</sup>, 1992, desenvolveram um trabalho para determinar se o peróxido de carbamida também penetra na câmara pulpar. Dentes anteriores humanos de adultos, recém-extraídos, tiveram suas raízes amputadas de 2 a 3 mm para apical da junção cimento-esmalte e a polpa dental foi removida. O interior de cada câmara pulpar foi preenchido com 25 µl de acetato 2 M tamponado com a intenção de absorver e estabilizar o peróxido que poderia se difundir para dentro da câmara pulpar. Os dentes foram divididos em cinco grupos, sendo um grupo controle e quatro experimentais. Os quatro grupos experimentais foram expostos por 15 minutos a 37° C aos seguintes tratamentos: peróxido de carbamida 10% (White and Bright) e 15% (Nu Smile), peróxido de hidrogênio 5% e 30% (Star

Bright). Após as exposições as amostras de acetato do interior da câmara pulpar foram removidas e preparadas para espectrofotometria UV em comprimento de onda de 596 nm para quantificar o peróxido que se difundiu para o interior da câmara. Os resultados mostraram que a quantidade de peróxido de hidrogênio encontrada no interior da câmara pulpar nos grupos submetidos ao peróxido de carbamida 10% e 15% foi de 3,3 µg e 4,8 µg, respectivamente. Os outros dois grupos que foram expostos ao peróxido de hidrogênio 5% e 30% tiveram um resultado de 10,4 µg e 40,4 µg, respectivamente. Os autores chamam a atenção para o fato de que, mesmo em curta exposição de 15 minutos ao peróxido de carbamida 10%, significativa quantidade de peróxido de hidrogênio se difundiu para o interior da câmara pulpar. Os autores também compararam o grupo experimental exposto ao peróxido de carbamida 15% com o grupo exposto ao peróxido de hidrogênio 5%. Esta comparação foi justificada pelo fato de que o peróxido de carbamida 15% possui um equivalente de peróxido de hidrogênio em torno de 5,25%. Assim sendo, uma menor quantidade de peróxido de hidrogênio atingiu a polpa através do peróxido de carbamida (4,8 µg) do que através do peróxido de hidrogênio livre a 5% (10,4 µg). Desta forma, os autores concluíram que a difusão do peróxido de hidrogênio através da coroa dental é de alguma forma limitada e que a taxa de difusão não é proporcional à concentração do peróxido de hidrogênio.

Lewinstein et al.<sup>42</sup>, 1994, examinaram o efeito do peróxido de hidrogênio 30% e da pasta de perborato de sódio misturada ao peróxido de hidrogênio em

diferentes temperaturas e intervalos de tempo sobre o esmalte e dentina humana. Dentes humanos íntegros foram seccionados, incluídos em resina acrílica e divididos em quatro grupos com diferentes tratamentos: G1- peróxido de hidrogênio 30% a 37°C; G2- peróxido de hidrogênio a 50°C associado a iluminação da câmara pulpar; G3- pasta de perborato de sódio misturado ao peróxido de hidrogênio a 37°C e G4- pasta de perborato de sódio misturado ao peróxido de hidrogênio a 50°C associado a iluminação da câmara pulpar. Um quinto grupo com dentes tratados com água destilada a 37°C ou 50°C serviu como controle. Cada grupo foi testado em três intervalos de tempo: 5, 10 e 15 minutos de tratamento. Os resultados indicaram que o tratamento com peróxido de hidrogênio 30% reduziu a microdureza do esmalte e da dentina (microdureza Vicker's). Esta redução foi estatisticamente significativa após 5 minutos de tratamento para a dentina e após 15 minutos para o esmalte. O tratamento com perborato de sódio misturado ao peróxido de hidrogênio não alterou a microdureza do esmalte e nem a da dentina em nenhuma das temperaturas ou intervalos de tempo testados. Desta forma, os autores sugeriram que o perborato de sódio parece ser menos agressivo para os tecidos dentais do que o peróxido de hidrogênio em altas concentrações utilizado isoladamente.

Thitinantapan et al.<sup>63</sup>, 1999, mediram a quantidade de peróxido de hidrogênio que atinge a polpa dental após 25 minutos de aplicação à 37°C, de 3 marcas diferentes de agentes clareadores de uso caseiro (peróxido de carbamida 10%): Opalescence, Sparkle, e Rembrandt. Setenta pré-molares humanos

extraídos foram divididos em 3 grupos experimentais (n=20) e 10 dentes serviram como grupo controle. Os dentes tiveram suas raízes amputadas à 3mm apical da junção cimento-esmalte, as polpas foram removidas e a câmara pulpar foi preenchida com solução tamponada de acetato imediatamente antes dos dentes serem tratados com os agentes clareadores. Após a aplicação do tratamento a solução foi removida e preparada para análise colorimétrica onde a densidade óptica foi medida a 596nm para leitura da quantidade de peróxido de hidrogênio na solução. A quantidade média de peróxido de hidrogênio medida foi:  $3,605 \pm 1,405\mu\text{g}$  (Opalescence);  $1,282 \pm 0,762\mu\text{g}$  (Sparkle); e  $0,339 \pm 0,251\mu\text{g}$  (Rembrandt). Os autores encontraram uma significativa diferença estatística entre os grupos, o que os levou a concluir que a penetração do peróxido de hidrogênio para a polpa dental varia significativamente em vários produtos comerciais, embora estes produtos apresentem a mesma concentração de peróxido de carbamida (10%), e que esta diferença pode estar associada a quantidade de carbopol (carboxypolyethylene polymer) no produto, uma vez que este composto é adicionado para aumentar a viscosidade e retardar a liberação do peróxido de hidrogênio, e conseqüentemente resultar em níveis diferentes de sensibilidade ou eficácia do tratamento clareador.

O efeito do peróxido de carbamida na camada subsuperficial do esmalte humano foi examinada pelos autores Potocnik et al.<sup>52</sup>, 2000. Eles estudaram a microdureza, microestrutura e conteúdo mineral de 6 dentes humanos extraídos, de tal maneira que os corpos de prova controle e testes foram obtidos do mesmo

dente. Os resultados mostraram que o gel de peróxido de carbamida 10% não afetou significativamente a microdureza do esmalte. A análise em microscopia eletrônica de varredura mostrou alterações locais na microestrutura do esmalte. Foi encontrada uma baixa concentração de Ca e F e adicionalmente a taxa Ca:P estava baixa após a exposição ao agente clareador. Também foi encontrado Ca e P no agente clareador após o uso. Os autores concluíram que as alterações microestruturais e químicas provocadas pelo peróxido de carbamida 10% no esmalte dental não são clinicamente significantes.

Gokay et al.<sup>26</sup>, 2000, conduziram um estudo onde se avaliou a quantidade de peróxido de hidrogênio liberada de agentes clareadores que penetra para o interior da câmara pulpar de dentes restaurados com diferentes materiais. Foram usados sessenta e cinco dentes humanos anteriores superiores extraídos que foram divididos em 13 grupos de 5 dentes cada. Um grupo controle com 5 dentes não foi submetido a nenhum tipo de preparo cavitário e restauração. Nos 60 dentes restantes foram realizadas cavidades de classe V e os dentes foram restaurados com três materiais: resina composta (Charisma), poliácido modificado com resina composta (Dyract), ou resina modificada por cimento de ionômero de vidro (Vitremer). Todos os dentes foram seccionados a 3 mm para apical da junção cimento-esmalte e o tecido pulpar da câmara foi removido. A câmara pulpar foi então preenchida com uma solução de acetato tamponado com a finalidade de absorver e estabilizar o peróxido que poderia penetrar na câmara pulpar. A superfície vestibular dos dentes foi exposta a quatro diferentes agentes clareadores



por 30 minutos à 37°C: peróxido de hidrogênio 30% e peróxido de carbamida nas concentrações de 10%, 15% e 30%. Os dentes do grupo controle foram expostos apenas à água destilada. Após as exposições a solução de acetato do interior da câmara foi removida e preparada com leucocristal violeta e a enzima horseradish peroxidase para que a densidade óptica da solução azul pudesse ser determinada espectrofotometricamente e convertida em equivalentes microgramas de peróxido de hidrogênio. Nos resultados ficou evidente que altas concentrações de peróxido de hidrogênio promoveram uma alta taxa de penetração de peróxido na câmara pulpar. As taxas de difusão do peróxido de hidrogênio na câmara pulpar foram: peróxido de hidrogênio 30% (25,88 – 31,64µg); peróxido de carbamida 10% (5,4 – 6,84µg); peróxido de carbamida 15% (7,38 – 7,86µg) e peróxido de carbamida 35% (8,46 – 12,48µg). Com relação aos materiais restauradores os resultados mostraram uma alta taxa de penetração de peróxido em todos os materiais testados, sendo que a maior taxa de penetração de peróxido foi encontrada no grupo restaurado com resina modificada por ionômero de vidro (Vitremer), seguido do poliácido modificado por resina (Dyract) e por último o grupo da resina composta (Charisma), que mostrou a menor taxa de penetração de peróxido. Os autores sugeriram que a quantidade de penetração pode ser afetada pelo tipo de material restaurador e que esta penetração é aumentada devido às propriedades do material restaurador com relação à microinfiltração marginal, uma vez que nenhum material restaurador foi capaz de prevenir completamente a microinfiltração.

Com a intenção de estabelecer uma homogeneidade das amostras em um trabalho de pesquisa em odontologia, Martineli et al.<sup>44</sup>, 2001, relataram a importância de se selecionar espécimes com índices de filtração próximos para uma melhor padronização dos resultados e, desta forma, evitar erros de interpretação dos resultados, quer seja subestimando ou superestimando-os. Os autores explicaram que existem dois mecanismos responsáveis pela passagem de substâncias pela dentina: a difusão e a filtração. A difusão é um processo pelo qual o transporte de substância é feito de uma área de alta concentração para a área de baixa concentração. Na difusão não há movimentação do fluido, mas somente deslocamento molecular. Na filtração, a movimentação do fluido ocorre de uma área de maior pressão hidrostática para uma área de menor pressão. A condutância hidráulica da dentina é dependente de uma série de variáveis, tais como: comprimento dos túbulos, o número de túbulos por unidade superficial de área, a pressão aplicada, a viscosidade do fluido e o raio do túbulo elevado à quarta potência. Esta variável pode ser modificada pela presença de *smear layer* e *smear plugs*, que regulam a condutância hidráulica. Desta forma, os estudos quantitativos da permeabilidade dentinária envolvem a medição da condutância hidráulica da dentina, que representa a filtração de líquidos através dos túbulos dentinários sob uma determinada pressão. Os autores descreveram um método para realizar a medição dos índices iniciais de filtração para todos os espécimes, possibilitando a diminuição da interferência de variações anatômicas que ocorrem de dente para dente na real interpretação dos dados. Esta medição pode ser feita submetendo-se cada disco de dentina ou espécime ao processo de filtração,

quando a passagem do líquido no interior dos túbulos dentinários é medida pela movimentação de uma pequena bolha de ar localizada na micropipeta justaposta a uma escala milimétrica, à uma determinada pressão e em um determinado espaço de tempo. Como a micropipeta apresenta o diâmetro interno constante, a divisão de sua capacidade volumétrica pelo seu comprimento resulta numa proporcionalidade que converte o deslocamento de líquidos através do disco de dentina ou do segmento de coroa.

Em um estudo *in vitro* onde utilizaram o oxalato de potássio em superfícies de dentina de dentes terceiros molares extraídos, Pashley et al., 2001, mostraram ser possível diminuir a permeabilidade dentinária através da oclusão dos túbulos dentinários causada pela formação de cristais de oxalato de cálcio sem conseqüente alteração na força adesiva da resina composta nestas superfícies. Os autores trataram as superfícies dentinárias com ácido fosfórico 32% (Bisco) por 15 segundos e enxaguaram. Após o condicionamento ácido, apenas metade da superfície foi tratada com gel de oxalato de potássio por 2 minutos e então um agente adesivo One Step ou Scotchbond Multi-Purpose foi aplicado, seguido de restauração com a resina composta (Z-100) sobre toda a superfície dentinária. Os espécimes foram estocados em água destilada por 24 horas, os dentes foram seccionados longitudinalmente separando a metade tratada com oxalato da metade não tratada (controle). Cada metade foi seccionada em cortes seriados com 0,7mm de espessura e recortados com a finalidade de reduzir a área adesiva em  $0,8\text{mm}^2$  para os testes de tensão. Foi também realizado o teste de condutância hidráulica

(Lp) pré e pós-tratamento em discos de dentina. Os resultados mostraram que os discos de dentina condicionados e tratados com oxalato de potássio causaram uma significativa redução na condutância hidráulica da dentina Lp ( redução de 80%,  $p < 0,05$ ). Não houve diferença estatística significativa entre a força adesiva entre as superfícies tratadas ou não com oxalato de potássio em nenhum dos sistemas adesivos. O agente adesivo One-Step resultou em força adesiva de  $25,8 \pm 9,2$  MPa para a superfície não tratada e  $27,8 \pm 8,9$ MPa para a superfície tratada com oxalato ( $p > 0,05$ ). O sistema adesivo Scotchbond Multi-Purpose mostrou força adesiva de  $22,9 \pm 7,9$ MPa e  $22,9 \pm 9,6$ MPa para as superfícies não tratada e tratada, respectivamente ( $p > 0,05$ ). As imagens de microscopia eletrônica de varredura mostraram que a aplicação do oxalato de potássio sobre a superfície condicionada resultou na formação de cristais dentro do túbulo em vez de na superfície. Observações na interface de adesão mostraram que a formação destes cristais dentro dos túbulos dentinários não comprometeram a formação da camada híbrida no topo da superfície dentinária.

Com o objetivo de investigar a capacidade de penetração de agentes clareadores na câmara pulpar em dentes restaurados, Benetti et al.<sup>8</sup>, 2004, utilizaram 60 incisivos laterais bovinos que foram seccionados a 3 mm abaixo da junção amelo-cemetária e a polpa coronária foi removida. Os dentes foram divididos em 6 grupos de 10 dentes, onde os grupos G1; G2 e G3 não foram submetidos a nenhum procedimento restaurador (dentes intactos) e os grupos G4; G5 e G6 foram submetidos a preparos cavitários de Classe V e restaurados com o

adesivo Scotchbond Multipurpose (3M Dental Products) e resina composta Durafill (Heraeus Kulzer). O interior da câmara pulpar foi preenchido com solução de acetato tamponado e em seguida foi realizado o tratamento com os agentes clareadores por 60 minutos à 37°C. Os grupos G1 e G4 foram imersos em água destilada (grupo controle), os grupos G2 e G5 receberam exposição ao peróxido de carbamida 10%, e os grupos G3 e G6 foram expostos ao peróxido de carbamida 35%. Após realizadas as exposições, a solução de acetato do interior da câmara pulpar foi removida e preparada para análise espectrofotométrica a 596 nm. Os resultados mostraram que a maior penetração do peróxido dentro da câmara pulpar foi encontrada nos dentes restaurados expostos ao peróxido de carbamida 35% ( $0,7897 \pm 0,3003\mu\text{g}$ ) seguido pelos dentes restaurados expostos ao peróxido de carbamida 10% ( $0,2954 \pm 0,2354\mu\text{g}$ ) e dentes intactos expostos ao peróxido de carbamida 35% ( $0,1310 \pm 0,0579\mu\text{g}$ ). Os grupos dos dentes intactos ou restaurados imersos em água destilada e o grupo dos dentes intactos expostos ao peróxido de carbamida 10% não tiveram diferença entre si. Desta forma, a quantidade de peróxido encontrada dentro da câmara pulpar dos grupos G2 e G5, expostos ao peróxido da carbamida 10% ( $0,1833 \pm 0,2003\mu\text{g}$ ) foi significativamente baixa ( $p = 0,001$ ) quando comparada com os grupos G3 e G6 que foram expostos ao peróxido de carbamida 35% ( $0,4606 \pm 0,3981\mu\text{g}$ ). A quantidade de peróxido de hidrogênio encontrada na câmara pulpar dos dentes restaurados ( $0,3863 \pm 0,3715\mu\text{g}$ ) foi significativamente maior do que nos dentes intactos ( $0,0747 \pm 0,0599\mu\text{g}$ ). Os autores concluíram que quanto maior a concentração do agente clareador maior a penetração do peróxido de hidrogênio

dentro da polpa dental, especialmente se estes dentes forem restaurados e sugerem que baixas concentrações de peróxido podem ser usadas com segurança em dentes restaurados.

Os reais mecanismos do clareamento dental e o papel do peróxido de hidrogênio ainda não estão bem esclarecidos. No entanto suspeita-se que a forte ação dos radicais hidroxilas  $\text{OH}^\cdot$ , gerados pelo peróxido de hidrogênio atuem nos componentes orgânicos da dentina e dos materiais pigmentados e que isto resulte no clareamento destes tecidos. Sabe-se que o radical hidroxila ( $\text{OH}^\cdot$ ) é uma forma de oxigênio ativo, tóxico e um radical livre. O radical  $\text{OH}^\cdot$  tem o potencial de causar danos ao tecido conjuntivo, membrana celular, ao DNA e outros tecidos. Kawamoto e Tsujimoto<sup>38</sup>, 2004, investigaram os mecanismos de ação dos agentes clareadores contendo peróxido de hidrogênio nos dentes e determinaram qual substância é responsável pela ação clareadora. O radical hidroxila  $\text{OH}^\cdot$  foi medido em várias concentrações de peróxido de hidrogênio através de ressonância de elétrons, o qual foi detectado uma relação direta entre a quantidade de radical hidroxila e o aumento da concentração de peróxido de hidrogênio. O efeito do peróxido de hidrogênio nas paredes da dentina foi observado usando microscopia eletrônica de varredura, onde foi observado uma dissolução da dentina intertubular e peritubular pelo peróxido de hidrogênio em altas concentrações. O aumento na concentração e no tempo de aplicação aumentaram os danos na dentina inter e peritubular. O peso das amostras tratadas com peróxido de hidrogênio 30% foi menor que o das amostras tratadas com peróxido de

hidrogênio em concentrações mais baixas. No entanto, a quantidade de cálcio dissolvida em cada amostra foi praticamente a mesma. A análise de difração de raios X mostrou que a hidroxiapatita não foi influenciada pelo peróxido de hidrogênio. Em adição os autores conduziram um estudo em três aminoácidos da dentina (prolina, alanina e glicina). Quando dois desses aminoácidos foram adicionados ao peróxido de hidrogênio houve um decréscimo na geração de radicais hidroxilas ( $\text{OH}^\cdot$ ), e nenhuma alteração foi detectada quando a glicina foi adicionada. Uma análise na estrutura desses aminoácidos através de ressonância magnética nuclear mostrou que a prolina foi completamente degradada pelo peróxido de hidrogênio 30%, a alanina foi sutilmente alterada e a glicina não foi afetada pelo peróxido de hidrogênio. De acordo com estes resultados, os autores sugeriram que o peróxido de hidrogênio e os radicais  $\text{OH}^\cdot$  não afetam os componentes inorgânicos da dentina mas afetam os componentes orgânicos desta estrutura. Estes fatos sugerem também que os radicais hidroxilas  $\text{OH}^\cdot$  são os principais responsáveis no processo do clareamento dental com peróxido de hidrogênio.

Sulieman et al.<sup>60</sup>, 2004, quantificaram *in vitro* a profundidade de alteração de cor na dentina em dentes clareados com agente clareador de uso em consultório odontológico à base de peróxido de hidrogênio 35%. Os dentes tratados com o agente clareador mostraram um nítido efeito no interior da dentina, sendo que este efeito foi reduzido de acordo com o aumento da espessura da dentina. Na porção coronal dos dentes a profundidade de clareamento atingiu a câmara pulpar, porém

na região cervical isso não ocorreu. Os autores mostraram que a alteração de cor ocorreu em profundidade uniforme no interior da dentina, atingindo uma profundidade de 31-38% para o interior desta, e concluíram que o clareamento não é um efeito apenas mascarador do esmalte dental.



## 2.2 Citotoxicidade dos agentes clareadores

Cohen e Chase<sup>12</sup>, 1979, realizaram um estudo histopatológico de polpas dentais tratadas com peróxido de hidrogênio 35% e calor com a finalidade de se avaliar a ocorrência de alterações pulpare e determinar se essas alterações eram transitórias ou permanentes. Neste estudo foram utilizados cinquenta e um pré-molares intactos de dezenove pacientes com indicação de exodontia por razões ortodônticas. Os pacientes foram submetidos a três sessões de 30 minutos de clareamento dental (15 minutos para cada face) com intervalos de 24 horas entre as sessões. O calor foi utilizado durante todo o tratamento e foi ajustado de acordo com a resposta e tolerância de cada paciente através de um dispositivo reostaticamente controlado em temperaturas entre 115F (46°C) a 135F (57°C), com uma temperatura média de 129F (53°C). Um dente de cada um dos 19 pacientes serviu como grupo controle. Os dentes tratados foram extraídos em três diferentes períodos pós-operatórios: uma hora, 15 dias e 30 dias após o tratamento clareador. Após a extração, os dentes foram preparados para análise histopatológica, que incluíram observações do formato celular, presença e localização do núcleo, variações na camada de odontoblastos, presença ou ausência da zona acelular, presença de células inflamatórias, presença de eritrócitos extra-vascular e avaliação das condições dos vasos sanguíneos na parte central da polpa. Sensibilidade dental ou dor espontânea pós-operatória foi relatada por 14 dos 19 pacientes (73%) e não ultrapassaram 24 horas. Todos os dentes dos grupos experimentais obtiveram resultados de vitalidade aos testes

elétricos realizados durante todo o tratamento clareador. A análise histopatológica mostrou que as condições pulpare dos grupos experimentais foram coerentes com o grupo controle. A zona rica em células estava intacta e células inflamatórias não estavam presentes na camada rica em células ou na porção central da polpa em nenhum dos tempos pós-operatórios analisados. A camada de odontoblastos estava intacta, exceto em áreas localizadas na junção cemento-esmalte que em 36% dos dentes apresentaram aspiração do núcleo dos odontoblastos para dentro dos túbulos. Porém, esta condição também foi encontrada no grupo controle, o que levou os autores a sugerirem que este fato pode ser atribuído às injúrias provocadas pelo fórceps durante o ato cirúrgico de exodontia. Os autores concluíram que, sob as condições deste estudo, o clareamento dental com peróxido de hidrogênio e calor, pode ser considerado inofensivo ao tecido pulpar.

Robertson e Melfi<sup>54</sup> em 1980 avaliaram histologicamente a resposta pulpar em dentes humanos hígidos à aplicação de peróxido de hidrogênio e calor, em associação ou separadamente. Foram selecionados sete pacientes entre 13 e 17 anos, que apresentavam seus dentes pré-molares indicados para exodontia por razões ortodônticas. Os quatro pré-molares de cada paciente foram distribuídos em quatro grupos: (1) Grupo controle, não recebeu nenhum tratamento; (2) calor (46 a 51°C) e solução de peróxido de hidrogênio 35% (Superoxol); (3) calor (46 a 51°C) e solução salina 9%; (4) apenas solução de peróxido de hidrogênio 35% (Superoxol) sem o uso de calor. Os grupos experimentais receberam duas aplicações de 5 minutos de cada tratamento com intervalo de 4 dias entre as

aplicações. Os dentes foram extraídos quatro dias após a última aplicação do tratamento. A avaliação histológica destes dentes revelou discreta resposta inflamatória (graduada entre 0,5 a 1,0) limitada no tecido pulpar superficial dos dentes submetidos ao tratamento de calor associado ao peróxido de hidrogênio (Grupo 2), o qual foi estatisticamente significativo quando comparado ao Grupo controle. O calor utilizado com solução salina e o peróxido de hidrogênio sozinho não causaram um número significativo de respostas inflamatórias quando comparados com o Grupo controle. No entanto, os autores chamaram a atenção para o fato de que, embora não tenha sido significativo quando comparado com o Grupo controle, o Grupo 4 (peróxido de hidrogênio sozinho) causou reação em 3 das 6 polpas analisadas, e que em uma amostra maior, os resultados poderiam ter sido significativos. Os autores afirmaram que o achado mais importante foi que o calor associado ao peróxido de hidrogênio, quando aplicado nas condições experimentais deste estudo, promovem irritação pulpar.

O peróxido de hidrogênio e o calor são dois componentes da técnica comumente usada em clareamento dental. Os efeitos destes dois componentes foram avaliados histologicamente em tecido pulpar de dentes de cães por Seale et al.<sup>56</sup>, 1981. Foram utilizados 4 dentes caninos de seis cães, que foram distribuídos em quatro grupos experimentais: Dente 1- recebeu tratamento apenas com peróxido de hidrogênio 35% por 30 minutos; Dente 2- recebeu tratamento com peróxido de hidrogênio 35% associado ao calor de 62°C (144F) aplicado por 1 segundo, espera de 3 segundos e reaplicado por mais 1 segundo e assim

sucessivamente por um período de 30 minutos; Dente 3- tratamento apenas com calor da mesma forma descrita para o dente 2, porém, em vez do peróxido de hidrogênio foi utilizado água destilada; Dente 4- grupo controle negativo, onde não foi utilizado nenhum tratamento clareador ou térmico, apenas o isolamento absoluto foi realizado por 30 minutos de maneira idêntica aos outros grupos experimentais. Os dentes receberam 4 aplicações do tratamento separadas por uma semana entre as aplicações. Os quatro dentes experimentais foram extraídos em 3 diferente períodos: 3, 25 e 60 dias após o término do tratamento, onde dois animais foram observados histologicamente para cada período. As avaliações histológicas após 3 dias do tratamento para os dentes que receberam o peróxido de hidrogênio 35% por 30 minutos, mostraram uma resposta pulpar marcante na área imediatamente sob a superfície do esmalte da face tratada, reação característica de uma inflamação aguda, com completa destruição dos odontoblastos e uma ausência total de pré-dentina não calcificada, denso infiltrado inflamatório e áreas de erosão da dentina, a qual os autores sugeriram ser a causa de uma aparente reabsorção interna. Os autores sugeriram que a destruição dos odontoblastos é provavelmente devida à natureza cáustica do peróxido de hidrogênio e a reabsorção interna pode ser atribuída à severa irritação. Já na polpa mais apical a resposta foi menos marcante, a camada de odontoblastos apresentou tamanho e forma normais. Os dentes que receberam o tratamento com peróxido de hidrogênio associado ao calor mostraram alterações semelhantes às descritas anteriormente para o grupo tratado apenas com peróxido de hidrogênio, onde a reação não mostrou ser mais intensa como resultado da associação do calor. As

polpas dos dentes tratados apenas com o calor e água não mostraram ter sido adversamente afetadas. A camada de odontoblastos se mostrou com forma e tamanho semelhantes às polpas do grupo controle. No período de 15 dias após o tratamento, ainda havia uma marcante resposta inflamatória tanto para o grupo clareado com peróxido sozinho como para o grupo associado ao calor, com achatamento e eventual aspiração dos odontoblastos subjacentes à face clareada, infiltrado inflamatório ainda presente e continuada atividade odontoclástica. Não foi observada nenhuma evidência de cura para estes grupos. O grupo tratado apenas com calor mostrou semelhanças com o grupo controle. Após 60 dias do tratamento, os dentes tratados com peróxido de hidrogênio sozinho ou associado ao calor mostraram resolução da resposta inflamatória, com evidências de reparação das áreas de reabsorção interna e a camada de odontoblastos subjacente à face clareada aparentava ter retornado ao estado funcional normal, embora ainda não apresentasse seu tamanho e forma originais. Toda a hemorragia e danos vasculares haviam desaparecido. Os autores concluíram que a adição de calor (63°C) ao tratamento clareador com peróxido de hidrogênio 35%, não mostrou intensificar os danos causados pelo peróxido de hidrogênio.

A técnica de clareamento dental modificada por McInnes foi desenvolvida para clareamento de dentes com fluorose dental e consiste na combinação de clareamento, abrasão e remoção química do pigmento. Baumgartner et al.<sup>7</sup>, 1983, desenvolveram um estudo com o propósito de determinar os efeitos histológicos para a polpa dental. Trinta e seis dentes pré-molares humanos de nove pacientes,

com indicação de exodontia por razões ortodônticas foram utilizados no estudo. Dois pré-molares, um superior e outro inferior foram submetidos a tratamento com a técnica de McInnes, enquanto os outros dois contra-laterais serviram de controle. A mistura para clareamento consistiu de 1ml de ácido clorídrico, 1 ml de peróxido de hidrogênio 30% e 0,2 ml de éter dietílico. A mistura foi aplicada na face vestibular dos dentes e deixada por um período de 5 minutos e depois foi removida, e um disco de granulação fina e com suave pressão foi utilizado por 15 segundos. Este procedimento foi repetido por 3 vezes, num tempo total de 15 minutos de clareamento e 45 segundos de abrasão com disco. Nos dentes que serviram de controle foi utilizado o mesmo procedimento, apenas substituindo a mistura clareadora por uma salina. Os dentes foram extraídos em intervalos de 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 17, e 19 dias após o tratamento. As análises histológicas mostraram que das 36 polpas examinadas, 25 polpas (12 do grupo controle e 13 tratadas) não apresentaram nenhuma alteração pulpar identificável. Seis polpas do grupo controle e cinco tratadas com a mistura clareadora apresentaram leve a moderada inflamação pulpar.

Com o propósito de avaliar os efeitos dos procedimentos clareadores em dentes com vitalidade pulpar à nível molecular, Bowles e Thompson<sup>10</sup>, 1986, examinaram os efeitos do peróxido de hidrogênio e calor, individualmente e em conjunto, em sete enzimas pulpares encontradas em dentes bovinos. Para isso, usaram um extrato de polpa bovina preparado imediatamente após o abate dos animais, o extrato foi mantido em temperatura de 4°C até serem realizados os

experimentos. As enzimas utilizadas foram: fosfatase alcalina, aldolase, glucose 6-fosfato desidrogenase (G6-PDH), soro glutâmico-oxaloacético transaminase (SGOT), isocitrato desidrogenase, malato desidrogenase e fosfoexose isomerase. Para o grupo que recebeu o tratamento com calor, as temperaturas utilizadas foram: 50°C por um tempo que variou de 1 a 30 min., após o tratamento as amostras foram resfriadas a 4°C para análise. O grupo do tratamento com peróxido de hidrogênio sozinho variou nas concentrações de 1,25 a 15%. No tratamento combinado de peróxido de hidrogênio e calor, as concentrações de peróxido de hidrogênio foram 2,5; 7,5 e 15% e o calor foi de 50°C por 7,5; 15 e 30 min, respectivamente. As atividades enzimáticas foram determinadas de acordo com a porcentagem em relação ao grupo controle, que não recebeu o tratamento. As análises foram realizadas por espectrofotometria usando luz visível UV. Os resultados mostraram que a sensibilidade das enzimas ao peróxido de hidrogênio em ordem decrescente foi: G6-PDH, isocitrato desidrogenase, malato desidrogenase, fosfatase alcalina, SGOT, aldolase e fosfoexose isomerase (PHI). Desta forma, a PHI foi a enzima menos afetada por qualquer concentração de peróxido de hidrogênio testada, mantendo 90% de sua atividade original após a exposição ao peróxido de hidrogênio 15%. A fosfatase alcalina e a MDH mantiveram de 40 a 30% de sua atividade, respectivamente. No entanto, a G6-PDH e a ICD foram as mais afetadas, com suas atividades completamente destruídas após todas as exposições ao peróxido de hidrogênio acima de 5%. O peróxido de hidrogênio na concentração de 15%, que foi a maior concentração testada, foi capaz de aumentar a inibição da atividade enzimática para todas as

enzimas testadas. Na sensibilidade ao teste do calor, após 30 minutos a G6-PDH manteve 5% da sua atividade original, SGOT manteve 60%, e as outras enzimas mantiveram 80% ou mais de sua atividade. A atividade da enzima isocitrato desidrogenase manteve-se inalterada em todas as variações de temperatura. Os autores afirmam que estes resultados indicam que o calor sozinho (50°C), ou seja 13°C acima do normal, apresenta pouco efeito nas enzimas testadas, e que este resultado está em concordância com outros estudos anteriores. Contudo, no tratamento combinado, calor associado ao peróxido de hidrogênio, até mesmo sob a condição mais amena (peróxido de hidrogênio 2,5% e 50°C por 7,5 minutos) ocorreu uma total inibição da G6-PDH e da isocitrato desidrogenase, e reduziu substancialmente a atividade de várias outras. Apenas a PHI e a SGOT mantiveram mais da metade de suas atividades originais. Os autores concluíram que as enzimas pulpareas são significativamente inibidas pelo peróxido de hidrogênio *in vitro*, principalmente quando associado ao calor, e afirmam que estes dados sugerem que a combinação de calor e peróxido de hidrogênio tem um potencial para danos biológicos ao tecido pulpar.

A catalase e a peroxidase são duas enzimas conhecidas pela capacidade de degradar o peróxido de hidrogênio. A peroxidase usa o peróxido de hidrogênio para oxidar outros substratos, enquanto a catalase quebra o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio. Com a finalidade de investigar se o tecido pulpar exibía ou não alguma atividade enzimática capaz de degradar o peróxido de hidrogênio liberado de agentes clareadores, Bowles e Burns Jr.<sup>9</sup>, 1992, utilizaram



um extrato de tecido pulpar obtido imediatamente após as extrações de dentes sadios (terceiros molares humanos). Este extrato foi analisado para a atividade da glutathione peroxidase e da catalase. Para isso, os autores adicionaram peróxido de hidrogênio 30% (Superoxol, Merck, Rahway, N.I.) ao extrato pulpar e determinaram a taxa de degradação do peróxido pelo extrato através de espectrofotometria, com taxa de absorbância da luz UV à 240nm para a catalase e 340nm para a glutathione peroxidase. Desta forma, o decréscimo na taxa de absorbância pode ser utilizada como um medidor para o decréscimo da concentração de peróxido de hidrogênio no extrato pulpar, analisando a atividade das duas enzimas. A atividade da enzima catalase encontrada no extrato pulpar foi de apenas  $2 \times 10^{-2}$   $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  de tecido. Os autores afirmaram que esta taxa foi muito baixa quando comparada com a taxa padrão da catalase que é de  $10^5$   $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ . A taxa da atividade da glutathione peroxidase foi determinada como ausente no extrato pulpar analisado. Os autores justificaram que o extrato de polpas dos dentes extraídos exibiu muito pouca retenção de sangue e que isto poderia influenciar na atividade enzimática. Contudo, durante a inflamação, uma maior quantidade de volume sanguíneo flui para o interior da polpa podendo contribuir para uma maior atividade da peroxidase. Além disso, a polpa dental apresenta esparsa população celular composta principalmente por fibroblastos, com um amplo volume de tecido conjuntivo extracelular, o qual pode contribuir para a baixa atividade enzimática.

Preocupados com a inadvertida exposição da dentina aos agentes clareadores dentais de uso caseiro, Hanks et al.<sup>30</sup>, 1993, desenvolveram um trabalho composto de três objetivos principais: 1) determinar a citotoxicidade de uma série de concentrações de peróxido de hidrogênio em cultura de células (Fibroblastos - Balb/c 3T3) através da resposta da enzima succinil desidrogenase; 2) medir *in vitro* a difusão do peróxido de hidrogênio de agentes clareadores através da dentina, utilizando um dispositivo simulador de câmara pulpar para determinar a quantidade de peróxido de hidrogênio que se difunde através de um disco de dentina de 0,5 mm após a aplicação de agentes clareadores; 3) determinar o risco do peróxido de hidrogênio em induzir citotoxicidade pulpar devido à difusão destes agentes clareadores através da dentina exposta. O preparo das soluções do peróxido de hidrogênio foi feito através de diluições de peróxido de hidrogênio 30% em PBS e análise colorimétrica, onde a absorbância foi medida a 596 nm. Foram feitas quatro réplicas experimentais para cada diluição do peróxido de hidrogênio em PBS. PBS sem o peróxido de hidrogênio foi usado como grupo controle. Para a análise de citotoxicidade foram utilizados fibroblastos Balb/c 3T3 que foram semeados em uma relação de 40.000 células/cm<sup>2</sup> em 96 “wells” em 100µL de meio de cultura por “well”. As células foram mantidas em incubadora com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, 95% de ar e 85% de umidade relativa à 37°C por 24 horas antes do experimento. Alíquotas de peróxido de hidrogênio foram diluídas em DMEM para fazer concentrações de 0 a 16 mmol/L, e após a remoção do meio de cultura antigo o novo meio contendo as diluições do peróxido de hidrogênio foram adicionados às células que, após este procedimento retornaram à

incubadora por 1 ou 6 horas antes da análise histoquímica da succinil desidrogenase (MTT). Para as medições da difusão do peróxido de hidrogênio através da dentina foram utilizados seis dispositivos de câmara pulpar *in vitro*, onde um disco de dentina de 0,5mm foi acoplado em cada dispositivo de tal modo que a difusão do agente clareador através do disco de dentina em direção à parte inferior da câmara pulpar que continha PBS pudesse ser medida através de análise colorimétrica. A condutância hidráulica ( $L_p$ :  $\mu\text{L}/\text{cm}^2/\text{min}/\text{cm H}_2\text{O}$ ) de cada disco foi determinada previamente a cada experimento. Após o agente clareador ser colocado na superfície oclusal de cada disco acoplado na câmara pulpar *in vitro*, eles foram incubados por 15 minutos, 1 hora e 6 horas em temperatura ambiente. Foram testados seis agentes clareadores: Britesmile (peróxido de hidrogênio em concentrações de 3% e 10%), Denta-Lite (peróxido de carbamida 10%), Dentlbright (peróxido de carbamida 10%), Rembrandt Lighten (Peróxido de carbamida 10%) e Union Broach Nu-Smile (peróxido de carbamida 15%). Após o teste as câmaras pulpares foram abertas e a difusão foi avaliada colorimetricamente para estabelecer a concentração de peróxido de hidrogênio em mmol/L de cada difusão nos diferentes períodos de tempo. Todos os agentes clareadores foram submetidos a leituras de osmolaridade (31 LAS Osmometer). Um novo teste de difusão dos discos de dentina foi realizado apenas nos períodos de 15 e 60 minutos para que se pudesse testar a citotoxicidade em cultura de células. Para isso, cultura de células fibroblastos Balb/c 3T3 foram semeadas em 96 “wells” da mesma forma já descrita anteriormente. Aliquotas de 100  $\mu\text{L}$  de cada difusão foi colocada em cada “well” e deixado por 1 hora a 37°C. Após este

período foi avaliada a atividade da succinil desidrogenase através do teste de MTT. Um controle negativo foi realizado adicionando PBS nos “wells” em vez da difusão dos agentes clareadores. Os resultados dos testes de citotoxicidade do peróxido de hidrogênio diluído (estoque) mostraram uma depressão da atividade da succinil desidrogenase com o aumento da quantidade de peróxido assim como do tempo. Desta forma, para o tempo de 1 hora de incubação, o valor da dose inibitória ( $ID_{50}$ ) para o peróxido de hidrogênio foi aproximadamente 0,58 mmol/L. Já para o período de 6 horas, a atividade enzimática caiu muito precipitadamente ( $ID_{50} = 0,44$  mmol/L), e mostrou apenas 5% de atividade enzimática após a exposição de 0,88 mmol/L de peróxido de hidrogênio. Os resultados do teste de difusão do peróxido de hidrogênio através dos discos de dentina mostraram que o peróxido de hidrogênio realmente se difunde através dos discos, sendo que a concentração do peróxido de hidrogênio na difusão dentro da câmara pulpar aumentou com o aumento no tempo para todos os agentes clareadores. A maior concentração de peróxido de hidrogênio dentro da câmara pulpar *in vitro* foi produzida pelo agente clareador BriteSmile (peróxido de hidrogênio 10%) em todos os tempos de difusão, seguido do Brite Smile (peróxido de hidrogênio 3%) e do U.B. Nu-Smile (peróxido de carbamida 15%). As concentrações dos agentes com peróxido de carbamida 10%: Denta-Lite, Dentlbright e Rembrandt Lighten não foram significativamente diferentes entre si em todos os períodos testados. A condutância hidráulica através de todos os discos de dentina foi similar para cada período de tempo, ou seja, os valores de condutância hidráulica ( $L_p$ ) para os discos de dentina antes do experimento variaram somente a um fator de 1,5 e

quando a condutância foi medida após os experimentos os valores de condutância hidráulica ( $L_p$ ) dos discos de dentina individuais não alteraram mais que 15%, sugerindo que a permeabilidade não foi alterada pelo peróxido de hidrogênio ou pelos agentes clareadores. Os resultados da citotoxicidade da difusão através dos discos de dentina no período de 15 minutos mostrou uma substancial depressão na atividade da succinil desidrogenase (SDH) para todos os agentes testados, sendo que o agente BriteSmile (peróxido de hidrogênio 10%) causou uma queda para menos de 10% da atividade da SDH em relação ao grupo controle. Desta forma, o coeficiente  $r^2 = 0,94$  indicou um forte relacionamento entre a concentração do peróxido de hidrogênio e a citotoxicidade ao Balb/c 3T3. Para o período de 1 hora de difusão, a média da atividade da SDH destes fibroblastos foi igual ou menor que 10% do controle negativo para todos os agentes clareadores. Os autores ressaltaram que a análise da citotoxicidade da difusão por 6 horas não foi realizado neste estudo, porém, como os testes mostraram que neste período a concentração de peróxido de hidrogênio na difusão por 6 horas foi muito maior, tudo leva a crer que a citotoxicidade neste período poderia ser menor que 10% de atividade da SDH. Os outros fatores testados como a osmolaridade, permeabilidade da dentina e o pH dos agentes clareadores não mostraram um correlacionamento positivo com a citotoxicidade ao Balb/c 3T3.

Wooverton et al.<sup>68</sup>, em 1993, avaliaram a letalidade e a mutagenicidade em ratos após administração oral com dois tipos de agentes clareadores de uso caseiro a base de peróxido de carbamida 10%, um deles contendo carbopol (Proxigel) e

outro não contendo (Gly-Oxide). Os autores avaliaram também a citotoxicidade *in vitro* promovida por estes dois agentes clareadores em fibroblastos de ratos, e compararam com a citotoxicidade de outros sete produtos odontológicos de uso geral: creme dental clareador (Epi-Smile), material restaurador temporário à base óxido de zinco e eugenol (IRM), soft liner para dentaduras (COE-Soft Denture Liner), material para cimentação de próteses (Fleck's Zinc Cement), material para cimentação temporária (Temp-Bond Base), creme dental convencional contendo fluoreto de sódio (Crest Toothpaste), e enxaguatório bucal (Plax). Para os testes de letalidade foram administrados 100 ml de cada dosagem teste introduzidas através de uma sonda esofágica. A mortalidade dos ratos foi observada de hora em hora até três dias após o início dos testes para determinar a concentração do produto que promoveria 50% de morte nos ratos testados ( $LD_{50}$ ). Os autores encontraram um valor de  $DL_{50}$  de 143,8 mg/kg para o peróxido de carbamida sem carbopol (Gly-Oxyde) e de 87,2 mg/kg para o peróxido com carbopol (Proxigel). A mutação genética foi obtida através do teste de Micronúcleo, onde o número de células micronucleadas por mil eritrócitos policromático por rato foi contado e expresso como frequência de mutação. Os resultados mostraram que os dois tipos de agentes clareadores testados não induziram mutação significativa em ratos nas condições testadas. Para o teste de citotoxicidade *in vitro*, fibroblastos de ratos (L929) foram semeados em quantidade de  $2,5 \times 10^4$  células em placas contendo 96 "wells" e incubadas a 37°C e 5% de  $CO_2$ . Após o período de incubação, o meio de cultura foi removido e substituído por peróxido de carbamida 10% diluído em meio de cultura. As células foram novamente incubadas por 18 horas nas mesmas

condições descritas anteriormente. A avaliação da citotoxicidade induzida pelos agentes clareadores nos fibroblastos de ratos (L929) foi determinada através de teste de viabilidade celular por pigmentação com cristal violeta. As medições da concentração do corante dissolvido com ácido acético foi determinada através de espectrofotometria (590nm). Um estudo adicional foi realizado para se determinar a citotoxicidade de sete outros materiais de uso odontológico com o objetivo de comparação ao peróxido de carbamida. Os ensaios foram realizados da mesma forma utilizada para os agentes clareadores. Os resultados de citotoxicidade mostraram houve 50% de morte celular em concentração de 0,62 mmol/L para o peróxido de carbamida sem carbopol e 1,88 mmol/L para o peróxido de carbamida com carbopol. Nas comparações de citotoxicidade realizada entre os dois agentes clareadores e os sete materiais odontológicos, os autores puderam concluir que os dois peróxidos de carbamida testados não se mostraram mais tóxicos que os outros materiais, com exceção do Coe-Soft, que não se mostrou tóxico para os fibroblastos, e os efeitos não foram significativamente diferentes do grupo controle.

Schulte et al.<sup>55</sup>, 1994, avaliaram e compararam respostas pulpare de dentes expostos ao peróxido de carbamida 10% (Opalescence, Ultradent Products), técnica caseira, por um período de quatro semanas em 28 pacientes. Foram testados dois diferentes tempos de exposição: 2 horas e “overnight”, ou seja durante toda a noite, em média sete horas. Foram utilizados apenas os dentes superiores de cada paciente, de incisivo central a primeiro pré-molar. Para avaliar

o estado pulpar os autores utilizaram dois métodos: elétrico e térmico (gelo). As respostas pulpares foram tomadas antes da exposição, 24 horas, 72 horas, uma, duas, três e quatro semanas de uso do gel clareador e dois meses após o término das exposições. Os testes térmicos de sensibilidade foram feitos no término do estudo (quarta semana) e dois meses após. Dos 28 pacientes, quatro interromperam o tratamento devido a sensibilidade térmica. Para os pacientes que completaram o tratamento, os resultados indicaram respostas pulpares normais em todos os períodos de tomada das respostas pulpares. Não houve diferença estatística entre os grupos com exposição ao agente clareador por duas horas ou por toda a noite (overnight). Os autores atribuíram este resultado ao fato de que o agente clareador provavelmente perde seu efeito com o passar do tempo, uma vez que os paciente não recarregaram a moldeira com nova quantidade de gel durante o uso. As respostas pulpares ao teste térmico (frio) não passaram de poucos segundos e não houve relato de dor espontânea.

Wataha et al.<sup>67</sup>, 1994, realizaram uma revisão de literatura sobre a citotoxicidade de alguns materiais restauradores e de uso odontológico que apresentam o potencial de causar danos ao tecido pulpar. Alguns destes materiais liberam substâncias que são responsáveis por esta toxicidade. Entre estas substâncias estão os componentes das resinas compostas, os íons metálicos e o peróxido de hidrogênio. A interação dos materiais e seus componentes com as células à nível molecular são, provavelmente, os responsáveis por reações teciduais, tais como inflamação, necrose, alterações imunológicas e



carcinogênicas. Os riscos tóxicos que alguns materiais podem causar à polpa dental *in vivo* podem ser parcialmente avaliados através de testes de citotoxicidade destas substâncias que são liberadas destes materiais *in vitro* e comparando esta citotoxicidade às concentrações utilizadas nos pacientes. A citotoxicidade que estas substâncias apresentam em testes de uso, e os riscos ao tecido pulpar, dependem da habilidade de se difundirem através da dentina e se acumularem na polpa dental. Os autores afirmaram que é importante se entender que um material conhecido como perigoso pode não impor significativo risco ao tecido, órgão ou corpo, ou seja, o risco pode ser reduzido devido a difusão ou diluição dos componentes através de barreiras biológicas, ou então por tempo insuficiente de contato dos componentes com os tecidos. Neste sentido, com a finalidade de imitar a barreira que pode existir *in vivo* é uma boa estratégia lançar mão do uso de barreiras entre o material e as células nos testes *in vitro*, principalmente nos testes de toxicidade da polpa dental, onde uma barreira de dentina pode ser usada.

Li<sup>43</sup>, em 1996, realizou uma revisão histórica dos agentes clareadores dentais com relação à toxicologia, informações sobre segurança e as propriedades biológicas do peróxido de hidrogênio. O autor cita que a atividade oxidativa do peróxido de hidrogênio é reativa às biomoléculas e capaz de desativar vírus e bactérias, sendo um popular agente anti-séptico. Em odontologia, vários produtos contendo peróxidos são utilizados em procedimentos dentais, tais como o peróxido de benzoíla (iniciador de polimerização em materiais resinosos), agentes anti-sépticos endodônticos e periodontais, e agentes clareadores dentais. As

reações oxidativas e danos tem sido reportados em proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos. Acredita-se que as reações oxidativas e subseqüentes danos celulares pelos radicais livres são os maiores mecanismos responsáveis pelas toxicidade observadas dos compostos contendo peróxidos. Este processo pode estar associado com carcinogênese e outras doenças degenerativas. A genotoxicidade do peróxido de hidrogênio na literatura tem sido controvertida e contraditória e pouco se sabe sobre o potencial dos peróxidos em induzirem mutação celular. A maioria dos estudos mostrando a genotoxicidade do peróxido de hidrogênio é apenas *in vitro*. Quando ativações enzimáticas foram incorporadas nestes estudos, o peróxido de hidrogênio não se mostrou genotóxico. Com relação à carcinogenicidade e efeitos teratogênicos, o autor relata que os resultados também são controvertidos e não conclusivos. Os efeitos citotóxicos do peróxido de hidrogênio nos tecidos dentais parecem estar intimamente associados à concentração do peróxido nos diversos produtos e materiais odontológicos. Estudos *in vitro* realizados com vários agentes clareadores dentais não mostraram efeitos genotóxicos nas células. Com relação aos testes de citotoxicidade, o autor enfatiza que os resultados dos estudos *in vitro* são mais previsíveis para riscos associados com efeitos tóxicos, quando as concentrações testadas correspondem com as utilizadas *in vivo*, em tecidos ou aplicações locais. Relata também que existem diferenças substanciais, incluindo muitos parâmetros fisiológicos e bioquímicos, entre o ambiente de cultura celular e todo o sistema animal *in vivo*, e que os processos metabólicos em sistemas animais são mais complexos e dinâmicos que os processos em cultura de células.

Koulaouzidou et al.<sup>40</sup>, 1998, estudaram *in vitro* a citotoxicidade do agente clareador com peróxido de uréia (Colgate Platinum) e do peróxido de hidrogênio em células L929 (fibroblastos da pele de ratos) e BHK21/C13 (fibroblastos de rim de filhotes de hamsters). As células foram cultivadas em meio de cultura (DMEM, Gibco) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e antibióticos (100UI/ml de penicilina e 100µg/ml de estreptomicina). As células foram incubadas a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> e 100% de umidade relativa. Após período de incubação, as células foram semeadas em discos de Petri na proporção de 200.000 células/disco em 4 ml de DMEM e cultivadas por 24 horas. Após 24 horas, 1 ml de DMEM contendo os agentes clareadores Colgate Platinum e peróxido de hidrogênio em concentrações de 0,01% a 0,00001% foram adicionadas em cada disco de Petri. Os discos foram novamente mantidos em incubadora por períodos de 24 e 72 horas. Para cada linhagem de fibroblastos foram preparadas quatro amostras para cada concentração dos agentes clareadores e também para cada período de incubação (24 ou 72 horas) e seus respectivos controles. Após os períodos de incubação (24 e 72 horas) o meio de cultura foi removido e 0,5 ml de 0,25% de tripsina em PBS foi adicionado aos discos para soltar as células. As células em suspensão foram introduzidas em hematocitômetro (câmara de Neubauer) e contadas em microscópio de luz. As células viáveis dos grupos experimentais foram comparadas com as células viáveis dos respectivos grupos controles. Um disco de cada grupo foi preparado para análise de morfologia celular em microscopia eletrônica de varredura. Nas culturas contendo tanto o

peróxido de uréia quanto o peróxido de hidrogênio houve queda na densidade celular, confirmando o efeito citotóxico dos agentes clareadores. Os dois agentes clareadores mostraram efeito dose-dependente e também tempo-dependente na viabilidade celular. Para a linhagem de células L929, a concentração de peróxido de hidrogênio capaz de causar inibição em 50% no número de células ( $ID_{50}$ ) foi de 0,00034% (0,0997 mmol/L) após 24 horas, e 0,00001% (0,0029 mmol/L) após 72 horas. Para a linhagem BHK21/C13 os valores foram de 0,00016% (0,0469 mmol/L) após 24 horas e 0,00007% (0,0205 mmol/L) após 72 horas de incubação. A dose inibitória ( $ID_{50}$ ) para o agente Colgate Platinum em células L929 foi de 0,00074% após 24 horas e 0,00045% após 72 horas e para a linhagem BHK21/C13 foi de 0,00055% e 0,00024%, após 24 e 72 horas respectivamente. As duas linhagens de células utilizadas neste estudo apresentaram diferenças em relação à sensibilidade aos agentes testados, sendo que as células BHK21/C13 foram mais sensíveis aos agentes clareadores do que as células L929. Este resultado levou os autores a concluir que linhagens diferentes podem apresentar diferentes sensibilidades ao mesmo material testado.

Anderson et al.<sup>3</sup>, 1999, realizaram um estudo clínico onde foi avaliada a presença da enzima Heme oxigenase- 1 (HO-1; Heat shock Protein 32 – HSP32) em dentes tratados com peróxido de carbamida 10%. Dezesete dentes pré-molares humanos íntegros com indicação ortodôntica para exodontia foram clareados com peróxido de carbamida 10% ( Opalescence, Ultradent Products) por quatro horas imediatamente antes da extração. Quatorze pré-molares adicionais

dos mesmos pacientes não foram clareados (Grupo controle). Esses dentes foram submetidos à um gel idêntico sem o peróxido de carbamida. Os dentes foram extraídos, fixados, desmineralizados, congelados, seccionados e submetidos à teste imunohistoquímico com anti-HO-1. As análises imunohistoquímicas para a HO-1 mostraram um resultado positivo para os odontoblastos adjacentes à superfície clareada. O resultado positivo é indicado por uma pigmentação de cor negra por todo o citoplasma, enquanto no resultado negativo há ausência de coloração negra. Os fibroblastos pulpare e células mesenquimais indiferenciadas localizadas mais interiormente na polpa não mostraram sinais de pigmentação negra, acusando um resultado imunohistoquímico negativo para tais células. O mesmo ocorreu com odontoblastos e células mesenquimais localizadas na porção radicular. No entanto, células endoteliais localizadas na polpa coronária foram pigmentadas positivamente. Já para os dentes que não foram submetidos ao tratamento clareador, grupo controle, estas mesmas células pulpare não mostraram nenhum tipo de pigmentação em seus citoplasmas, apresentando um resultado imunohistoquímico negativo. Apesar dos resultados mostrarem que não houve diferença estatística significativa para a presença de HO-1 entre os dentes clareados ou não clareados, os achados histoquímicos puderam sugerir que odontoblastos localizados na polpa coronal e células endoteliais subjacentes podem ter um potencial para responder a estresses oxidativos através do aumento da síntese de HO-1 (HSP32). Os autores ressaltaram que este evento pode representar um componente inicial da resposta de defesa feita por células

específicas em locais estratégicos na polpa, precedendo o clássico trajeto inflamatório.

Costa et al.<sup>16</sup>, 2001, avaliaram *in vitro* os efeitos de três soluções usadas para lavagem química em exposições pulpares. Os autores semearam células odontoblastóides (MDPC-23) 30.000 células/cm<sup>2</sup> que foram incubadas por 72 horas em 24 “wells”. Após a contagem das células em microscópio de luz invertida, foram adicionados 20 µL das soluções experimentais e controle em 980 µL de meio de cultura. As soluções experimentais foram: peróxido de hidrogênio 3%, solução salina de hidróxido de cálcio (5 g de Ca(OH)<sub>2</sub> em 10 ml de água destilada estéril) e solução de NaOCl. Os grupos controles positivo e negativo foram solução de agente adesivo Syntac Sprint (SS) e solução salina de tampão fosfato (PBS), respectivamente. Após a incubação por 120 minutos o número de células foi novamente contado e a morfologia celular foi avaliada em microscopia eletrônica de varredura e o metabolismo celular foi determinado através de teste MTT (methyltetrazolium). Os resultados mostraram que o peróxido de hidrogênio 3%, solução de NaOCl e solução de adesivo (SS) foram mais citotóxicos que a solução de hidróxido de cálcio Ca(OH)<sub>2</sub> ou PBS. Nos grupos do peróxido de hidrogênio ou SS, poucas células permaneceram aderidas no fundo dos “wells”. O peróxido de hidrogênio, NaOCl e SS suprimiram a atividade da enzima mitocondrial em 97,7%, 97,3%, e 95,0%, respectivamente. Por outro lado, o Ca(OH)<sub>2</sub> deprimiu o metabolismo celular em apenas 5%. Enquanto o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,

NaOCl and SS causaram mudanças extremas na morfologia celular, o  $\text{Ca(OH)}_2$  e o PBS não promoveram alterações dramáticas na morfologia celular.

González-Ochoa<sup>28</sup>, 2002, desenvolveu um estudo *in vivo* onde avaliou alterações histológicas em polpas dentais após o clareamento dental com peróxido de carbamida 10% (Opalescence). Foram utilizados 59 dentes de 15 pacientes com indicação ortodôntica para exodontia. Os dentes foram divididos em quatro grupos para serem analisados: 1-)avaliação após 4 dias de clareamento caseiro; 2-) avaliação após 2 semanas de clareamento; 3-) avaliação após 2 semanas de clareamento seguidas de mais duas semanas de espera sem clareamento; 4-) avaliação do grupo controle, que não foi clareado. Os resultados das análises mostraram que nenhuma das polpas exibiu inflamação moderada ou severa após os dentes serem expostos ao peróxido de carbamida. Foi encontrada leve reação pulpar em 16 dos 45 dentes clareados, com pequeno aumento de células na zona acelular, ocorrência casual de células inflamatórias, pouco extravasamento de células sanguíneas e alterações vasculares menores. Nenhuma reação pulpar foi encontrada nas análises dos dentes que foram tratados por duas semanas seguidas de duas semanas de recuperação, o que levou a autora a concluir que o clareamento dental com peróxido de carbamida por até duas semanas pode ser considerado seguro para a polpa dental, e que as pequenas alterações pulpares causadas neste período são reversíveis dentro de duas semanas após o término do clareamento.

Zouain-Ferreira et al.<sup>69</sup>, 2002, estudaram os efeitos de quatro agentes clareadores (Insta-Brite, Karisma, Opalescence e Whiteness) na indução lisogênica e sobrevivência de cepas de *Escherichia coli*. Para isso, culturas de *E. coli* foram encubadas com os agentes clareadores. Os resultados mostraram que os agentes clareadores testados promoveram indução lisogênica e decréscimo na sobrevivência das cepas de bactérias. Os autores afirmaram que estes fenômenos podem ser explicados pela liberação de espécies de oxigênio reativos gerados pelos agentes clareadores, e que estes oxigênios reativos têm o potencial de causar apoptose celular, são mutagênicos e carcinogênicos. Estes resultados sugeriram que os agentes clareadores são capazes de induzir danos ao DNA em bactérias orais.

Aren<sup>4</sup>, 2003, avaliou os efeitos citotóxicos do peróxido de hidrogênio 35% e do peróxido de carbamida 20% em células FM3A (carcinoma mamário de ratos). As células foram semeadas em quantidade de  $5 \times 10^5$  células/mL em 5 mL de meio de cultura, suplementado com 10% de soro fetal bovino e antibióticos em cada “well” de uma placa contendo seis “wells”. O peróxido de hidrogênio 35% (50µg/mL) foi adicionado ao meio de cultura contendo as células e foi incubado por 24 horas à 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. O peróxido de carbamida (40µg/mL) foi adicionado em outra placa contendo 6 “wells” e incubados nas mesmas condições anteriores. Após as 24 horas de incubação o meio de cultura foi removido e as células foram tripsanizadas e contadas em hematocitômetro. A viabilidade celular foi avaliada através de teste de *trypan blue* (0,4%) e determinada por comparação



com o grupo controle negativo em células que não foram tratadas com agente clareador. A viabilidade celular para o peróxido de hidrogênio 35% (50µg) foi de 60%, enquanto a do peróxido de carbamida 20% (40µg) foi de 43,5% em relação ao grupo controle (99,1%). Os dois agentes clareadores testados foram citotóxicos para as células FM3A.

Com o objetivo de avaliar e comparar a resposta pulpar de polpas de ratos capeadas com cimento de resina modificada com ionômero de vidro ou sistema adesivo auto-condicionante, Costa et al.<sup>19</sup>, 2003, prepararam cavidades de classe I em superfície oclusal de 54 primeiros molares de 27 ratos. As exposições pulpares foram realizadas nas paredes pulpares e os materiais resinosos foram aplicados como agentes capeadores pulpares: G1, Clearfil Liner Bond 2V (CLB 2V; Kuraray Co., Japan); G2, Vitrebond (VIT; 3M/ESPE, USA). O grupo 3 (controle) foi tratado com pasta de hidróxido de cálcio (CH; Labsynth, Brazil). As cavidades foram restauradas com amálgama. Após 7, 30 e 60 dias, os animais foram sacrificados e as amostras foram processadas para avaliação microscópica. Os resultados mostraram que apesar da resposta inflamatória causada pelos materiais experimentais e controle após o sétimo dia, foi encontrada saúde pulpar associada à formação de barreira calcificada após 60 dias da terapia pulpar. Ambos os materiais resinosos promoveram deposição de matriz de fibrodentina sobre o corno pulpar no local de exposição pulpar. A polpa dental remanescente mostrou características pulpares normais.

Kanno et al.<sup>37</sup>, 2003, avaliaram *in vitro* a capacidade do peróxido de hidrogênio 30% em produzir estresses oxidativos e causar citotoxicidade, apoptose e genotoxicidade em células de ratos (P388). Os autores examinaram também um anti-oxidante natural (Naringin), um bioflavonóide encontrado em frutas cítricas, e avaliaram suas propriedades antioxidantes e anti-apoptóticas para estas células. A citotoxicidade foi determinada pela atividade mitocondrial (*MTT assay*) e a apoptose e danos ao DNA foram analisados por condensação de cromatina e *Comet assay* (eletroforese), respectivamente. Os resultados mostraram que o tratamento das células apenas com o peróxido de hidrogênio 30% (30μM) por 24 horas induziram citotoxicidade, apoptose e danos ao DNA celular (genotoxicidade). Os autores detectaram apoptose através das alterações na morfologia nuclear e pigmentação do DNA das células P388 com corante H33342. Os núcleos das células tratadas com peróxido de hidrogênio (30μM) demonstraram falhas consistentes e apoptose com contração celular, condensação do núcleo e fragmentação. Por outro lado, quando as células foram pré-tratadas por 15 minutos com o antioxidante Naringin ou a GSH (forma reduzida da glutathione), típico antioxidante intracelular, houve redução na citotoxicidade celular e além disso, a condensação de Cromatina e danos ao DNA foram suprimidos. Os autores sugeriram que a provável causa da proteção que o Naringin promove na citotoxicidade celular pode estar relacionada à capacidade inibidora de apoptose celular.

**Proposição**

---

### **3 Proposição**

O objetivo da presente pesquisa foi avaliar o efeito transdentinário de um agente clareador preparado com três diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio, determinando seus efeitos citotóxicos sobre células de linhagem odontoblástica MDPC-23 em cultura.

## **Material e método**

---

## **4 Material e método**

### **4.1 Obtenção dos discos de dentina**

Cinquenta discos de dentina foram obtidos à partir de terceiros molares humanos íntegros extraídos por razões ortodônticas, os quais foram doados por pacientes após autorização através de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, conforme protocolo N° 37/04 do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Araraquara (Anexos 1, 2 e 3). Após as extrações, os dentes foram imersos em etanol 70% à temperatura ambiente por 5 dias e submetidos à remoção de restos de ligamento periodontal e debris aderidos à sua superfície.

Discos de dentina com 0,5mm de espessura foram obtidos através do corte transversal da coroa dentária em duas regiões, sendo uma acima da projeção dos cornos pulpaes e outra abaixo da junção amelo-dentinária oclusal (Figura 1). Para isso, os dentes foram fixados em placas de madeira com godiva de baixa fusão (Figura 2a) de tal maneira que o seccionamento fosse realizado, utilizando-se para isto um disco de diamante (11-4254, 4"x 0,012" / série 15LC, Diamond Wafering blade, Buehler Ltda., Lake Bluf, IL, USA) acoplado ao aparelho para cortes seriados (ISOMET 1000, Buehler Ltda., Lake Bluf, IL, USA) (Figuras 2b e 2c). Durante o corte, a superfície oclusal de cada disco foi demarcada com grafite, o que permitiu definir, de maneira simples e preliminar, a superfície oclusal e pulpar de cada disco para o posterior cultivo celular.



FIGURA 1- Esquema ilustrativo da obtenção do disco de dentina.



FIGURA 2a - Dente fixado em placa de madeira.

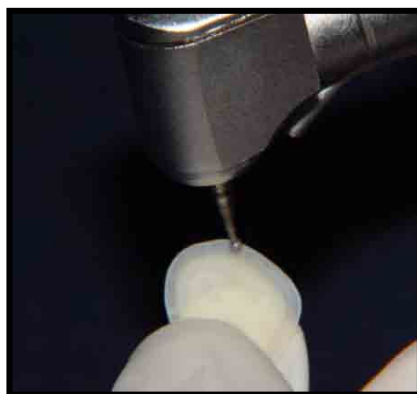
FIGURA 2b – Vista Frontal do aparelho de corte (ISOMET 1000).

FIGURA 2c- Dente posicionado para o corte.

Após obtenção dos discos, estes foram avaliados em lupa estereoscópica. A presença de esmalte ou persistência de corno pulpar sobre as superfícies destes discos de dentina eram sinais suficientes para que se procedesse o descarte dos mesmos. Assim, foram selecionados discos que apresentassem apenas tecido dentinário em sua região central. Esta constituiu-se uma das etapas mais importantes da obtenção e padronização dos discos de dentina, uma vez que resíduos de esmalte resultantes de profundas cicatrículas e fissuras, ou áreas

correspondentes aos cornos pulpaes podem reduzir ou exacerbar, respectivamente, a difusão transdentinária de fluidos, resultando em alteração na permeabilidade natural dos discos, comprometendo os resultados do estudo (PASHLEY<sup>49</sup>, 1988).

A superfície oclusal de cada disco foi demarcada com duas leves ranhuras próximo ao limite amelo-dentinário, realizada com ponta diamantada esférica número 1011 (KG Sorensen, Barueri, SP, Brasil) em baixa rotação, permitindo a identificação da superfície oclusal e pulpar de cada disco (Figuras 3a e 3b). Os discos foram submetidos a medições de espessura através de um paquímetro digital (Modelo 500-144B, Mitutoyo Sul América Ltda. SP, Brasil) (Figura 4), sendo que suas superfícies foram regularizadas com lixas d'água de granulação 400 e 600 (T469-SF- Noton, Saint-Gobam Abrasivos Ltda., Jundiaí, SP, Brasil) realizando-se para isto movimentos giratórios manuais para cada granulação de lixa. Durante a regularização com as lixas, os discos foram concomitantemente submetidos a medições de espessura, certificando-se de que apresentavam  $0,5(\pm 0,2)\text{mm}$ .



Demarcação  
da superfície  
oclusal

FIGURA 3a – Demarcação da superfície oclusal do disco com Baixa Rotação.

FIGURA 3b – Demarcação concluída.



Os discos de dentina foram acondicionados em placas de acrílico (Costar Corp., Cambridge, MA, USA), com 24 compartimentos (“wells”) (Figura 5).



FIGURA 4 - Paquímetro digital (Mitutoyo).



FIGURA 5- Discos de dentina acondicionados em placas de acrílico com 24 compartimentos.

Para desinfecção dos discos de dentina, foi aplicado 1mL de etanol 70% por um período de 6 horas, nos compartimentos que continham seus respectivos discos (HANKS et al.<sup>29</sup>, 1989), os quais foram então lavados (3 trocas de 5 minutos cada) com tampão fosfato (PBS, pH = 7,4). Uma solução de EDTA 0,5M, pH 7,2 foi utilizada para condicionar as superfícies dos discos de dentina. Para isto, uma bolinha de algodão embebida com a solução de EDTA foi aplicada, sob agitação, sobre os discos pelo período de 60 segundos. Após este período, a solução de EDTA foi lavada das superfícies dos discos com água deionizada esterilizada. Este procedimento teve como objetivo a limpeza superficial e remoção da *smear layer*, promovendo a desobstrução dos túbulos dentinários, padronizando desta forma, os espécimes para o teste de permeabilidade

(MARTINELLI et al.<sup>44</sup>, 2001). Além disso, este procedimento proporciona adequado substrato dentinário para adesão e crescimento celular durante o teste de citotoxicidade (COSTA e HANKS<sup>14</sup>, 1998; COSTA e HANKS<sup>15</sup>, 1999). Finalmente, os discos de dentina preparados para o experimento de citotoxicidade foram novamente acondicionados em compartimentos contendo PBS esterilizado, sendo que cada um deles foi submetido, individualmente, ao teste de condutância hidráulica.

#### 4.2 MEDIÇÃO DA CONDUTÂNCIA HIDRÁULICA

A condutância hidráulica de um tecido expressa a facilidade com que o fluido pode mover-se através de uma superfície, sob uma determinada pressão, em um espaço de tempo. Outhwaite et al.<sup>48</sup>, em 1974, desenvolveram um dispositivo para facilitar o estudo da permeabilidade dentinária, o qual consiste de uma câmara com sua parte superior aberta, em contato com o meio ambiente, conhecido por *In Vitro Pulp Chamber* ou câmara de filtração (Figura 6).

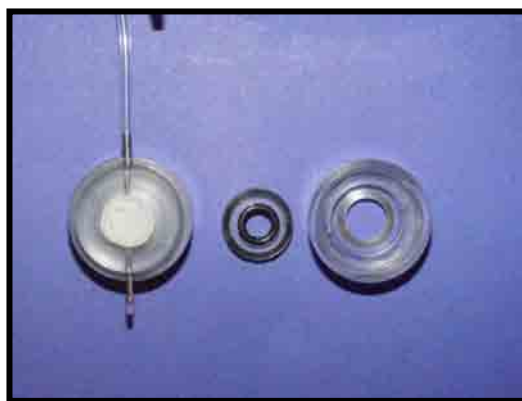


FIGURA 6- Câmara de filtração.

Essa câmara apresenta uma porção superior e uma inferior que são adaptadas por rosqueamento e recebe o disco de dentina para a realização das medições na condutância hidráulica. A câmara de filtração é a parte final de um aparato complexo, formando um único sistema para medir a condutância hidráulica.

O sistema começa a funcionar quando a válvula de uma coluna de água de uma altura determinada é aberta e libera a água que exerce uma pressão hidrostática (Figura 7). Este reservatório ou coluna de água é conectado diretamente à uma micropipeta através de capilares de polietileno siliconado com diâmetro de 18 Gauges (Embramed, São Paulo, SP, Brasil). A pressão será expressa em centímetros de água (cm H<sub>2</sub>O), ou então poderá, convenientemente, ser convertida para Kpa, onde 1 cm H<sub>2</sub>O = 0,098 Kpa. A micropipeta está justaposta a uma escala de medição em milímetros, que servirá para medir o deslocamento do líquido numa fração de tempo, conforme a velocidade de filtração dos discos de dentina. O deslocamento da água deionizada é visualizado através da movimentação de uma microbolha criada por uma seringa acoplada a uma extensão capilar entre a micropipeta e a câmara de filtração. A câmara de filtração é a parte final do sistema que abriga os discos de dentina e fica conectada à coluna de pressão hidrostática por meio dos capilares de polietileno. Um dispositivo semelhante ao esquema anteriormente descrito foi montado no Laboratório de Patologia Experimental do Departamento de Patologia e Fisiologia da Faculdade de Odontologia de Araraquara da Universidade Estadual Paulista –

UNESP, para testes de condutância hidráulica como parte deste trabalho de pesquisa. O dispositivo apresenta uma coluna de água de 1,8 metros de altura, correspondendo à pressão de 180cm H<sub>2</sub>O ou 17,65 Kpa (Figura 8).

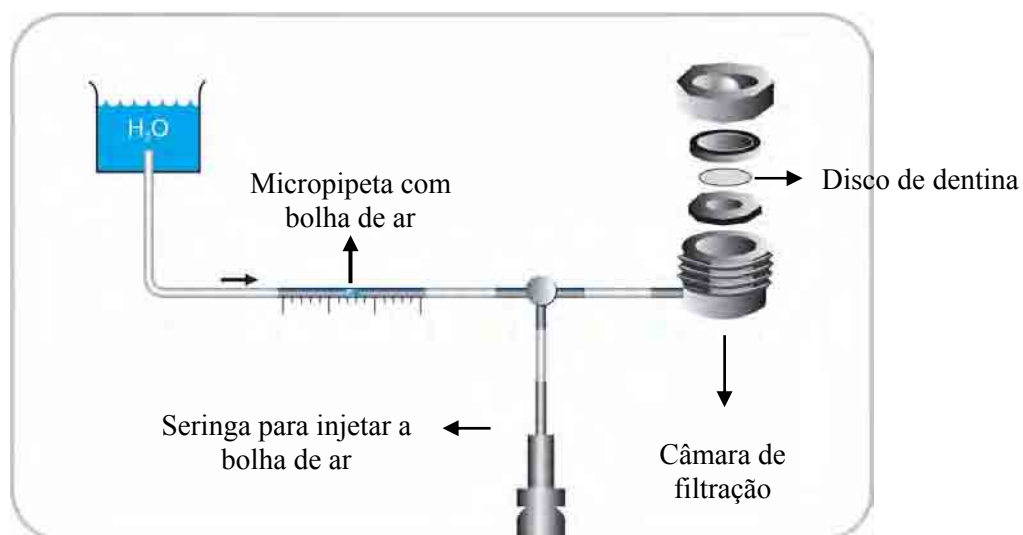


FIGURA 7 - Esquema ilustrativo do dispositivo utilizado para medições da condutância hidráulica dos discos de dentina.

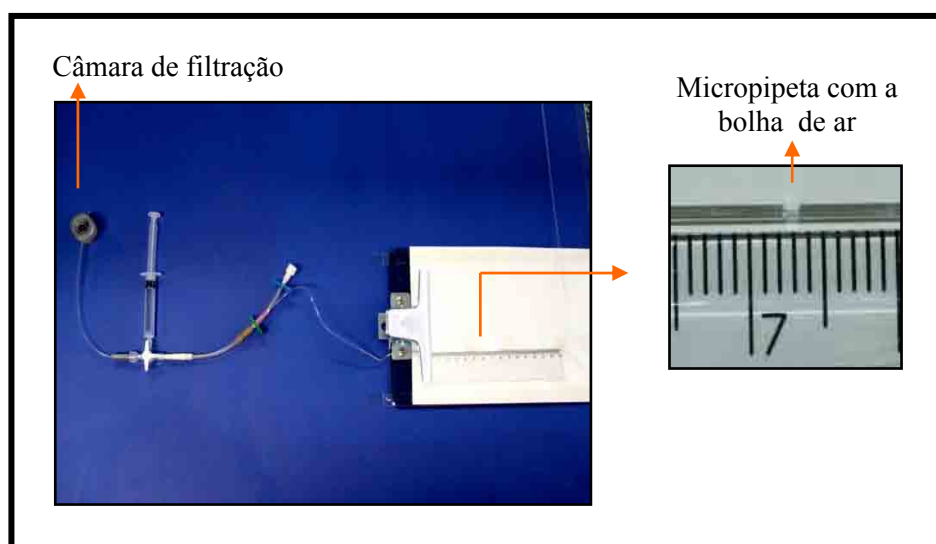


FIGURA 8- Dispositivo para análise de condutância hidráulica com pressão hidrostática utilizado neste trabalho.

#### 4.2.1 Cálculo da condutância hidráulica

A condutância hidráulica da dentina foi calculada pela taxa de medições do fluxo, usando a equação:

$$Lp = \frac{Jv}{A.P}$$

onde:

**Lp**: condutância hidráulica da dentina ( $\mu\text{l cm}^{-2} \text{ min}^{-1} \text{ cm H}_2\text{O}$ ).

**Jv**: taxa de fluxo do fluido ( $\mu\text{l/min}$ ).

**A**: área do disco de dentina ( $\text{cm}^2$ ).

**P**: pressão hidrostática através do disco de dentina ( $\text{cm H}_2\text{O}$ ).

#### Cálculo do Jv

$$Jv = \frac{V}{t}$$

$$Jv = \frac{n}{t} \cdot \frac{\pi \cdot 1,024^2}{4}$$

onde:

**n** : deslocamento da bolha de ar medido em milímetros.

**t** : tempo decorrido necessário para a bolha de ar deslocar em mm.

#### Cálculo da área A do disco de dentina.

$$A = \frac{\pi \cdot d^2}{4}$$

onde:

d: diâmetro do anel (o-ring) = 0,442 cm.

### **Pressão hidrostática**

P = 180 cm H<sub>2</sub>O.

### **Cálculo do Lp**

$$Lp = \frac{n}{t} \cdot \frac{\pi \cdot 1,024^2}{4} \cdot \frac{1}{180} \cdot \frac{4}{\pi \cdot 0,442^2}$$

$$Lp = \frac{n}{t} \cdot \frac{1,024^2}{180 \cdot 0,442^2}$$

$$Lp = \frac{n}{t} \cdot 0,0298$$

Com o objetivo de eliminar ou reduzir as diferenças entre as amostras utilizadas neste trabalho de pesquisa, foi realizada a medição dos índices iniciais de filtração para todos os discos de dentina. Este procedimento permitiu padronizar os testes através da diminuição da interferência de permeabilidade causada por variações anatômicas que porventura possam ocorrer entre a mesma estrutura presente em diferentes elementos dentários, favorecendo a correta interpretação dos resultados (MARTINELLI et al.<sup>44</sup>, 2001). Após os teste de condutância hidráulica, os discos foram distribuídos em grupos, de modo que não houvesse diferença estatisticamente significante entre os valores numéricos

médios obtidos para cada grupo formado. Os cinquenta discos de dentina selecionados de acordo com os valores de condutância hidráulica foram divididos em cinco grupos de dez discos cada (Tabela 1).

Tabela 1- Divisão dos discos de dentina segundo condutância hidráulica ( $L_p^*$ ) FOAr – 2005

| Disco | Grupo 1 ( $L_p$ ) | Grupo 2<br>( $L_p$ ) | Grupo 3<br>( $L_p$ ) | Grupo 4<br>( $L_p$ ) | Grupo 5<br>( $L_p$ ) |
|-------|-------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| 1     | 0,00150           | 0,00120              | 0,00150              | 0,00150              | 0,00150              |
| 2     | 0,00210           | 0,00180              | 0,00210              | 0,00210              | 0,00195              |
| 3     | 0,00255           | 0,00285              | 0,00225              | 0,00225              | 0,00225              |
| 4     | 0,00270           | 0,00390              | 0,00300              | 0,00240              | 0,00240              |
| 5     | 0,00315           | 0,00390              | 0,00315              | 0,00390              | 0,00330              |
| 6     | 0,00570           | 0,00570              | 0,00540              | 0,00570              | 0,00540              |
| 7     | 0,00600           | 0,00600              | 0,00690              | 0,00600              | 0,00600              |
| 8     | 0,00630           | 0,00630              | 0,00630              | 0,00630              | 0,00630              |
| 9     | 0,00720           | 0,00720              | 0,00720              | 0,00720              | 0,00720              |
| 10    | 0,00780           | 0,00780              | 0,00780              | 0,00780              | 0,00750              |

$$L_p^* = \mu\text{L mm}^{-2} \text{ min}^{-1} \text{ cm}^{-1} \text{ H}_2\text{O}$$

Após divisão dos grupos, os discos de dentina selecionados foram desgastados em sua área total, de forma que o diâmetro final fosse de 8mm. Os desgastes foram realizados com ponta diamantada cilíndrica número 1095 (KG Sorensen) em alta rotação, com acabamento em baixa rotação (Figuras 9a, 9b e

9c). A redução da área total dos discos de dentina com relação ao seu diâmetro foi realizada para que se pudesse posicionar estes discos num dispositivo metálico especialmente preparado para o desenvolvimento da presente pesquisa. Assim, os discos foram posicionados no dispositivo de tal maneira que sua superfície pulpar permanecesse voltada para baixo. Este recurso permitiu a aplicação do material clareador experimental na superfície oclusal (voltada para cima) dos discos durante os testes, enquanto a superfície pulpar (onde as células foram cultivadas) permaneceu em contato com o meio de cultura (DMEM).



FIGURA 9a- Delimitação em 8mm do disco de dentina com grafite.

FIGURA 9b- Recorte do disco.

FIGURA 9c- Discos recortados em diâmetro.

#### **4.3 Dispositivo porta-disco de dentina**

Para este estudo foi desenvolvido um dispositivo com a finalidade de adaptar o disco de dentina durante o teste de viabilidade celular. Este dispositivo confeccionado em aço inoxidável, apresenta formato cilíndrico com 9mm de altura. O topo deste dispositivo apresenta uma abertura com 8mm de diâmetro até



4mm para apical, onde ocorre uma redução do diâmetro para 6mm (Figura 10). Esta característica do dispositivo foi determinada para permitir que o disco de dentina fosse adequadamente alojado. O compartimento inferior apresenta perfurações circulares desenvolvidas com a finalidade de permitir livre difusão do meio de cultura entre a parte externa e interna do dispositivo (Figuras 11a e 11b).

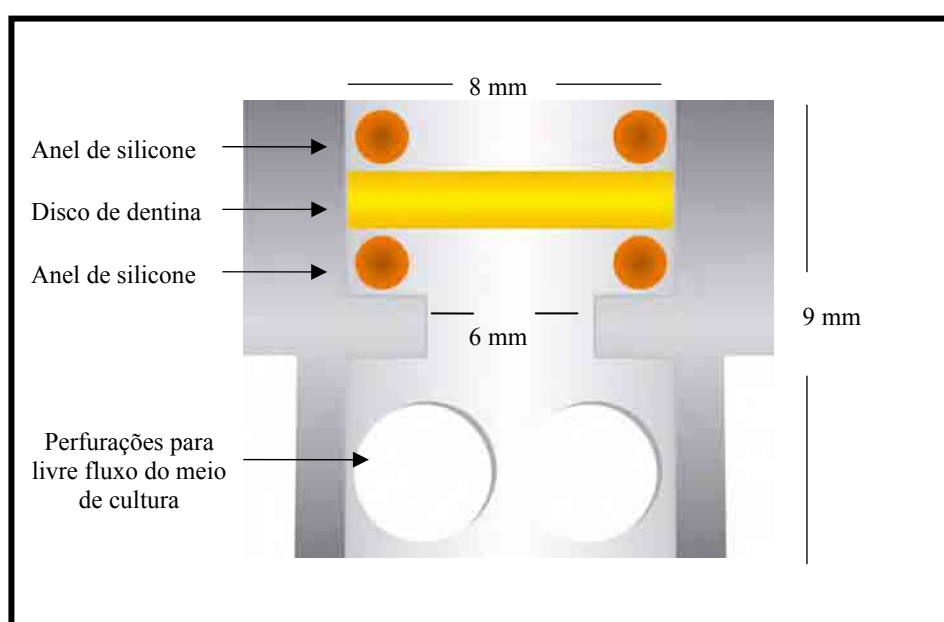


FIGURA 10 - Esquema ilustrativo do dispositivo porta-disco de dentina.



FIGURA 11a - Dispositivo porta-disco.



FIGURA 11b – Vista superior do dispositivo porta-disco.

Os discos de dentina foram posicionados nos dispositivos entre dois anéis de silicone “o-ring” (Orion – São Paulo, SP, Brasil) com diâmetro interno de 4,47mm e espessura de 1,78mm. Os anéis, além de manterem o disco em posição, também permitiram o vedamento lateral entre os compartimentos inferior e superior do dispositivo. Assim, não havia a possibilidade dos agentes clareadores experimentais na forma de gel alcançar, quando aplicados sobre a superfície oclusal dos discos, as bordas laterais dos mesmos (Figuras 12a, 12b e 12c). Desta maneira, a mistura de material experimental com meio de cultura foi prevenida. O conjunto dispositivo/discos e anéis de silicone foram autoclavados individualmente em recipientes de vidro contendo água deionizada, pelo período de 15 minutos, à 120°C e pressão de 1 Kg/força.



FIGURA 12a - Adaptação do primeiro anel de silicone no dispositivo metálico.

FIGURA 12b - Adaptação do disco de dentina sobre o anel de silicone.

FIGURA 12c - Adaptação do segundo anel de silicone sobre o disco de dentina formando um só conjunto.

#### **4.4 Manutenção das células MDPC-23 em cultura.**

Para avaliação da citotoxicidade dos materiais experimentais, foram utilizadas células imortalizadas de linhagem odontoblástica MDPC-23 ( HANKS et al.<sup>31</sup>, 1998; HANKS et al.<sup>32</sup>, 1998; SUN et al.<sup>62</sup>, 1998). Estas células foram descongeladas e cultivadas em garrafas plásticas de 75 cm<sup>2</sup> (Costar Corp., Cambridge, MA, USA) (Figura 13) em meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle's Médium (DMEM, SIGMA Chemical Co., St. Louis, MO, USA) contendo 10% de soro fetal bovino (SFB, Cultilab, Campinas, SP, Brasil), 100 IU/mL e 100 µg/mL, respectivamente, de penicilina e estreptomicina, e 2 mmol/L de glutamina (GIBCO, Grand Island, NY, USA). As células eram subcultivadas a cada 3 dias em incubadora (Isotemp Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA) com atmosfera umidecida contendo 5% de CO<sub>2</sub>, 95% de ar e temperatura de 37°C. Esta subcultura foi obtida à partir do deslocamento das células que estavam aderidas ao substrato plástico da base das garrafas de 75cm<sup>2</sup> através de aplicação de EDTA 0,05M em tampão fosfato pelo tempo de 5 minutos na temperatura de 37°C. Então as células eram suspensas em DMEM contendo 10% de soro fetal bovino e contadas em microscopia de luz invertida, utilizando-se para isto uma câmara de Newbauer. Assim, o repique das células foi realizado diversas vezes até que se obtivesse o número adequado de células para execução da pesquisa.



FIGURA 13 - Garrafa plástica para cultivo celular.

Os discos de dentina já posicionados nos dispositivos metálicos e autoclavados foram levados para câmara de fluxo laminar (Bio Protector Plus 12, Veco do Brasil – Ind. Com. de Equipamentos Ltda, Campinas, SP, Brasil), sendo este conjunto disco/dispositivo colocados de maneira invertida nos compartimentos “wells” das placas de acrílico de 24 “wells” (Coastar Corp. Cambridge, MA, USA). Assim, a superfície pulpar dos discos ficaram posicionadas para cima, permitindo que as células MDPC-23 fossem semeadas e crescessem no substrato dentinário da superfície pulpar destes discos (Figura 14a). Nestes compartimentos contendo os dispositivos com os discos, as células MDPC-23 foram semeadas ( $50.000 \text{ células/cm}^2$ ) (Figuras 14b e 14c). As placas com os discos foram mantidas por 72 horas em incubadora com atmosfera úmida à  $37^\circ\text{C}$  com 5% de  $\text{CO}_2$  e 95% de ar.



FIGURA 14a – Inversão dos dispositivos com a superfície pulpar voltada para cima.

FIGURA 14b – Células com meio de cultura sendo semeadas na superfície pulpar dos discos acoplados ao dispositivo metálico.

FIGURA 14c – Cultivo celular realizado.

Como já demonstrado em pesquisas anteriores (COSTA et al.<sup>17</sup>, 2000), após este período de 72 horas de incubação, as células odontoblastóides entram em confluência sobre a superfície pulpar do disco de dentina, simulando a camada odontoblástica, a qual reveste internamente a câmara pulpar em dentes íntegros. Então, cada dispositivo com os discos de dentina foi cuidadosamente removido dos seus compartimentos “wells” e posicionados de tal forma que as células cultivadas sobre a superfície pulpar do disco de dentina viessem permanecer em contato contínuo com o meio de cultura (superfície voltada para baixo). Então, o material clareador foi aplicado na superfície oclusal do disco de dentina (voltada para cima), simulando as condições clínicas (Figura 15).



FIGURA 15 – Dispositivo posicionado dentro do “well” com a superfície do disco de dentina voltada para cima e o meio de cultura em contato com as células cultivadas na superfície pulpar do disco (inferior).

#### 4.5 Agente Clareador

O agente clareador utilizado foi o peróxido de hidrogênio (Lase Peroxide, DMC Products, São Carlos, SP, Brasil) - (Tabela 2) nas concentrações de 7,5%; 20% e 35%. Este agente é considerado um material dual, ou seja, de ativação física e química, através da aplicação de fontes de luz. Na presente pesquisa foi utilizada apenas a ativação química. Para isso, o material foi manipulado de acordo com as recomendações do fabricante, onde se utilizou uma proporção de 3 gotas de peróxido de hidrogênio para uma gota de espessante (Figuras 16a, 16b e 16c). Após a manipulação, o pH dos materiais foi medido utilizando-se um pHmetro digital (GEHAKA PG 2000, Diadema, SP, Brasil) (Tabela 3).

Tabela 2 - Composição do agente clareador – DMC- FOAr, 2005

| Fase Peróxido          | Fase espessante             |
|------------------------|-----------------------------|
| Peróxido de Hidrogênio | Glicol                      |
| Agente Sequestrante    | Amina                       |
| Carbômero              | Amida                       |
|                        | Extratos vegetais e corante |

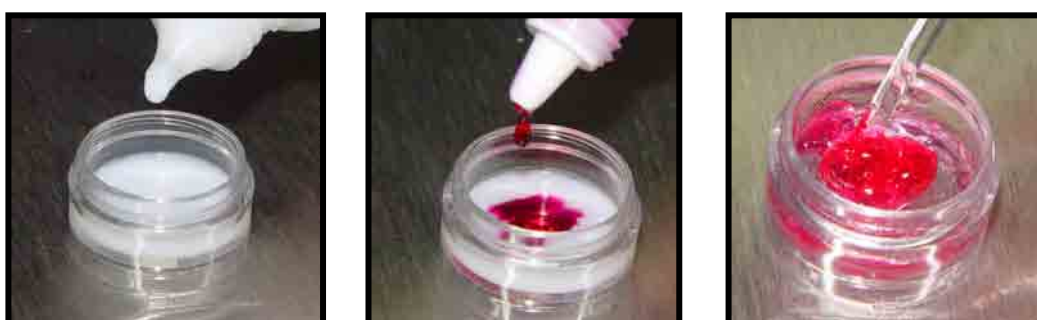


FIGURA 16a – Gotejamento da fase 1 do agente clareador.

FIGURA 16b – Gotejamento da fase 2 do agente clareador (espessante).

FIGURA 16c – Mistura do agente clareador.

Tabela 3 – pH dos materiais experimentais, FOAr, 2005

| Material                              | pH do Material |
|---------------------------------------|----------------|
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 7,5%    | 7,2 ± 1        |
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 20%     | 7,3 ± 1        |
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 35%     | 5,6 ± 1        |
| Gel sem H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | 7,2 ± 1        |

Os grupos experimentais e controle foram definidos da seguinte maneira:

Grupo 1 – agente clareador com 7,5% de  $H_2O_2$ ; Grupo 2 – agente clareador com 20% de  $H_2O_2$ ; Grupo 3 – agente clareador com 35% de  $H_2O_2$ . No Grupo 4 um gel semelhante aos utilizados nos grupos 1; 2 e 3, porém sem a adição de  $H_2O_2$ , foi aplicado nos discos de dentina. Já no Grupo 5 (controle negativo), os discos não foram submetidos ao tratamento. Os grupos experimentais e controle, bem como o número de discos de dentina tratados estão demonstrados na Tabela 4. Com seringas para insulina, aproximadamente 270mg do material foi aplicado sobre a superfície dos discos de dentina até o preenchimento de todo o espaço interno do anel de vedação, o qual estava posicionado sobre o disco (Figuras 17a e 17b).

Tabela 4 - Número de amostras divididas em cada Grupo experimental de acordo com o tipo de tratamento, FOAr, 2005

| Grupos | Número de discos | Tratamento              | Tempo (minutos) |
|--------|------------------|-------------------------|-----------------|
| 1      | 10               | $H_2O_2$ 7,5%           | 30              |
| 2      | 10               | $H_2O_2$ 20%            | 30              |
| 3      | 10               | $H_2O_2$ 35%            | 30              |
| 4      | 10               | Gel sem $H_2O_2$        | 30              |
| 5      | 10               | Grupo Controle Negativo | -               |



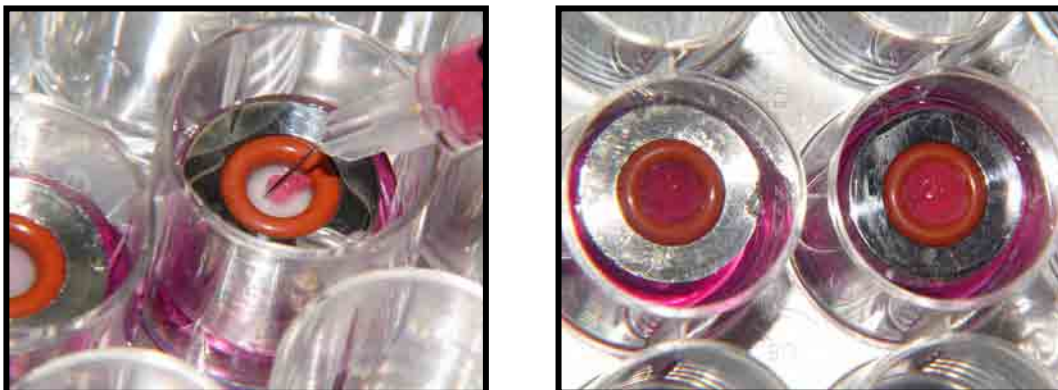


FIGURA 17a – Agente clareador sendo aplicado.

FIGURA 17b – Material aplicado sobre a superfície oclusal dos discos.

O agente clareador permaneceu por 15 minutos sobre os discos, sendo então removido por aspiração com cânulas (Pasteur) esterilizadas. Este procedimento se repetiu novamente, de tal maneira que a superfície oclusal dos discos fosse tratada com os agentes experimentais pelo período total de 30 minutos. O tempo de 15 minutos em cada aplicação foi sugerido pelo fabricante que recomenda um tempo de 7 a 10 minutos para tratamentos com auxílio de fontes por luz e 10 a 15 minutos para tratamento sem fontes de luz. Após a segunda e última aplicação do agente clareador, este foi removido por sucção e a superfície do disco foi lavada com 1 mL de solução de tampão fosfato por 2 vezes com concomitante sucção. Imediatamente após o teste, o anel de silicone superior foi removido liberando o disco de dentina do dispositivo, o qual foi posicionado em outro “well” de tal forma que a superfície pulpar fosse mantida voltada para cima. Então, as células que permaneceram aderidas ao substrato dentinário foram submetidas à análise de viabilidade celular (MTT).

#### 4.6 Análise da Viabilidade Celular

Seis discos de dentina de cada grupo experimental e controle foram utilizados para a avaliação do metabolismo celular. Esta avaliação foi realizada através da análise da aplicação da técnica do metiltetrazolium (MTT Assay). Este método determina a atividade da enzima desidrogenase succínica produzida pelas mitocôndrias presentes nas células. Para a preparação da solução de MTT, 25 mg do sal de metiltetrazolium foi pesado em balança analítica de alta precisão (AG 2000 GEHAKA, Diadema, SP, Brasil) e, posteriormente, adicionados a 5 mL de solução salina de tampão fosfato (PBS), alcançando uma mistura final de concentração igual a 5mg/mL (Mosmann<sup>46</sup>, 1983).

Sobre a superfície pulpar dos discos de dentina foi adicionado 900µL de meio de cultura (DMEM) associado a 100µL de solução de MTT (5 mg/mL de PBS). Esta solução sobre os discos com as células foi incubada em estufa umidificada na temperatura de 37°C pelo tempo de 4 horas. Decorrido este período, os pratos de acrílico foram retirados da incubadora, sendo que a mistura do meio de cultura com a solução do sal de metiltetrazolium mais PBS foi aspirada cuidadosamente.

Então, uma solução composta por 250µL de isopropanol acidificado com HCl 0,4N foi aplicada em cada compartimento com o objetivo de dissolver os cristais violeta resultantes da clivagem do anel do sal de metiltetrazolium pela enzima desidrogenase succínica das mitocôndrias das células viáveis (Figura 18). Após agitação e verificação da homogeneidade das soluções com suas possíveis

diferenças de tonalidade violeta, duas alíquotas de 100 $\mu$ L de cada compartimento foram transferidas para uma placa de 96 “wells” (Costar Corp., Cambridge, MA, USA) (Figura 19).



FIGURA 18 - Teste de MTT aplicado sobre células que permaneceram aderidas aos discos de dentina.



FIGURA 19- Aliquotas de 100 $\mu$ L obtidas pela dissolução dos cristais violeta. Note as variadas tonalidades das soluções caracterizando diferenças no metabolismo celular de acordo com os grupos avaliados.

A viabilidade celular foi avaliada de maneira proporcional à absorbância determinada à 570nm em leitor de ELISA (Multiskan, Ascent 354, Labsystems CE, Lês Ulis, France). Os dados numéricos obtidos pela técnica de MTT foram submetidos à análise estatística de Kruskal-Wallis complementada pelo teste de Mann-Whitney. Estes mesmos valores numéricos foram convertidos em média calculada para cada grupo e transformados em porcentagem. Os valores percentuais obtidos indicaram o efeito inibitório da atividade mitocondrial das células.

#### **4.7 Análise da morfologia celular e características da dentina por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).**

Para cada grupo, foram preparadas quatro amostras representativas para análise em microscopia eletrônica de varredura (MEV). Dois discos de dentina foram preparados para análise da morfologia celular e dois discos foram fraturados ao meio para análise das características da dentina. Para isto, os discos de dentina tratados (Grupos 1; 2; 3 e 4) ou não (controle) com os agentes experimentais, foram fixados por 8 horas em glutaraldeído a 2,5%.

Após este procedimento, as seguintes etapas de processamento das amostras para análise da morfologia celular foram seguidas:

- a. Lavagem por três vezes com 1mL de PBS (5 minutos cada lavagem);
- b. Pós-fixação em 200μL de tetróxido de ósmio a 1% por 60 minutos;
- c. Lavagem por outras duas vezes em 1mL de PBS (5 minutos cada);
- d. Lavagem por duas vezes com 1mL de água destilada (15 minutos cada);
- e. Desidratação por meio de trocas ascendentes de soluções de etanol - 30%, 50% e 70%, 2x 95% e 2x 100% (30 minutos em cada solução);
- f. Lavagem por duas vezes com 200μL de HMDS - Hexametildisilazante (SIGMA Chemical Co., St. Louis, MO, USA), 20 minutos cada.

Ao final de todas as etapas de processamento, a solução de HMDS foi aspirada do interior dos compartimentos e os discos de dentina foram transferidos para um outro prato de acrílico esterilizado, para que assim pudessem ser mantidos pelo tempo de 12 horas no dissecador. Ao término deste período, todas as amostras foram fixadas em “stubs” metalizadas com ouro (Figura 20), e analisadas em microscópio eletrônico de varredura (ZEISS DSM 940 A, Cal Zeiss Inc., Obakachen, Germany).



FIGURA 20- Amostras montadas em “stubs” e metalizadas em ouro. Note que o disco da direita foi fraturado ao meio e posicionado verticalmente para a análise da morfologia da dentina. O disco da esquerda foi montado de tal maneira que sua superfície pulpar (com células cultivadas) permanecesse voltada para cima.

## **Resultado**

---

## 5 Resultado

### 5.1 Análise estatística dos dados numéricos referentes ao teste de permeabilidade dentinária (condutância hidráulica)

Os dados estatísticos referentes a permeabilidade dentinária obtida para cada disco de dentina avaliado e posteriormente utilizados isoladamente nos grupos experimentais e controle estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 - Relação entre grupos experimentais e controle, número de espécimes, mediana, média e desvio padrão de acordo com a variável permeabilidade dentinária, FOAr, 2005

| Grupos                                   | Variável                  | n | Média   | Mediana | Desvio padrão |
|------------------------------------------|---------------------------|---|---------|---------|---------------|
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 7,5%       | Permeabilidade dentinária | 6 | 0,00443 | 0,00440 | 0,00230       |
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 20%        | Permeabilidade dentinária | 6 | 0,00480 | 0,00453 | 0,00228       |
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 35%        | Permeabilidade dentinária | 6 | 0,00428 | 0,00430 | 0,00232       |
| (Gel sem H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) | Permeabilidade dentinária | 6 | 0,00480 | 0,00448 | 0,00230       |
| Controle                                 | Permeabilidade dentinária | 6 | 0,00435 | 0,00433 | 0,00231       |

A aplicação do teste de Kruskal-Wallis aos dados expressos na Tabela 5 demonstrou haver igualdade entre as médias de permeabilidade ( $p = 1,000$ ).

## 5.2 Análise estatística dos dados numéricos referentes ao metabolismo celular

As taxas do metabolismo celular para os grupos experimentais, em porcentagem, de acordo com as diferentes concentrações do agente clareador à base de peróxido de hidrogênio, estão demonstrados na Tabela 6. As taxas de redução do metabolismo celular em função da concentração do agente clareador estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 6 - Taxa do metabolismo celular em porcentagem, em função dos grupos experimentais, FOAr, 2005

| <b>Grupos Experimentais</b> | <b>Grupo 1</b><br>H <sub>2</sub> O <sub>2</sub><br>7,5% | <b>Grupo 2</b><br>H <sub>2</sub> O <sub>2</sub><br>20% | <b>Grupo 3</b><br>H <sub>2</sub> O <sub>2</sub><br>35% | <b>Grupo 4</b><br>H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 0%<br>(Gel sem H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) | <b>Grupo 5</b><br>(controle) |
|-----------------------------|---------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------|
| Somatória                   | 0,6062                                                  | 0,6122                                                 | 0,5579                                                 | 1,3463                                                                                         | 1,6229                       |
| Média                       | 0,0505                                                  | 0,0510                                                 | 0,0464                                                 | 0,1121                                                                                         | 0,1352                       |
| Porcentagem %               | 37,35%                                                  | 37,72%                                                 | 34,31%                                                 | 82,91%                                                                                         | 100%                         |

Tabela 7- Taxa de redução do metabolismo celular em porcentagem, em comparação com o grupo controle negativo, FOAr, 2005

| <b>Grupos experimentais</b> | <b>Grupo 1</b><br>H <sub>2</sub> O <sub>2</sub><br>7,5% | <b>Grupo 2</b><br>H <sub>2</sub> O <sub>2</sub><br>20% | <b>Grupo 3</b><br>H <sub>2</sub> O <sub>2</sub><br>35%% | <b>Grupo 4</b> H <sub>2</sub> O <sub>2</sub><br>0%<br>(Gel sem H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) | <b>Grupo 5</b><br>(Controle) |
|-----------------------------|---------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------|
| Porcentagem %               | 62,65%                                                  | 62,28%                                                 | 65,69%                                                  | 17,09%                                                                                         | 0%                           |



Os dados referentes ao metabolismo das células MDPC-23 submetidas aos diferentes procedimentos representativos de cada grupo experimental e controle estão demonstrados na Tabela 8. Estes valores foram obtidos à partir dos dados coletados no teste de MTT em Leitor Universal de Elisa (Anexo 4). Seis compartimentos da placa de acrílico que receberam 100µL da solução de tampão fosfato caracterizaram a ausência completa de metabolismo celular, determinado na tabela como “blanc”.

Tabela 8 - Relação entre grupos experimentais e controle, número de espécimes, mediana, média e desvio padrão de acordo com a variável metabolismo celular, FOAr, 2005

| Grupos                                   | Variável            | n | Média  | Mediana | Desvio padrão |
|------------------------------------------|---------------------|---|--------|---------|---------------|
| <i>Blanc</i> *                           | Metabolismo celular | 6 | 0,0387 | 0,0386  | 0,0000        |
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 7,5%       | Metabolismo celular | 6 | 0,0505 | 0,0512  | 0,0028        |
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 20%        | Metabolismo celular | 6 | 0,0510 | 0,0507  | 0,0036        |
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 35%        | Metabolismo celular | 6 | 0,0465 | 0,0469  | 0,0026        |
| (Gel sem H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) | Metabolismo celular | 6 | 0,1122 | 0,1161  | 0,0193        |
| Controle                                 | Metabolismo celular | 6 | 0,1352 | 0,1274  | 0,2560        |

\**Blanc* caracteriza a ausência completa de metabolismo.

Devido a ausência de distribuição normal dos dados de metabolismo celular (Shapiro-Wilk,  $p \leq 0,05$ ), o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis foi aplicado para comparar as médias dos grupos em estudo.

O teste estatístico aplicado, demonstrou haver diferença significativa entre os grupos ( $p \leq 0,0001$ ). Desta maneira, os grupos foram comparados aos pares,

utilizando-se para isto o teste de Mann-Whitney, cujos resultados estão demonstrados na Tabela 9.

Tabela 9 - Teste de Mann-Whitney aplicados para comparação pareada dos grupos, FOAr, 2005

| Par comparado                                                                 | Valor de p* |
|-------------------------------------------------------------------------------|-------------|
| <i>Blanc</i> vs H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (7,5%)                          | 0,004       |
| <i>Blanc</i> vs H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (20%)                           | 0,004       |
| <i>Blanc</i> vs H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (35%)                           | 0,004       |
| <i>Blanc</i> vs Gel sem H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>                         | 0,004       |
| <i>Blanc</i> vs controle                                                      | 0,004       |
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (7,5%) vs H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (20%)   | 0,749       |
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (7,5%) vs H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (35%)   | 0,037       |
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (7,5%) vs Gel sem H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | 0,004       |
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (7,5%) vs controle                              | 0,004       |
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (20%) vs H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (35%)    | 0,037       |
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (20%) vs Gel sem H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>  | 0,004       |
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (20%) vs controle                               | 0,004       |
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (35%) vs Gel sem H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>  | 0,004       |
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (35%) vs controle                               | 0,004       |
| Gel sem H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> vs controle                             | 0,200       |

\* valores de  $p \leq 0,05$  indicam diferença estatística entre os grupos comparados.

Os resultados apresentados na Tabela 6 estão visualmente representados na Figura 21.

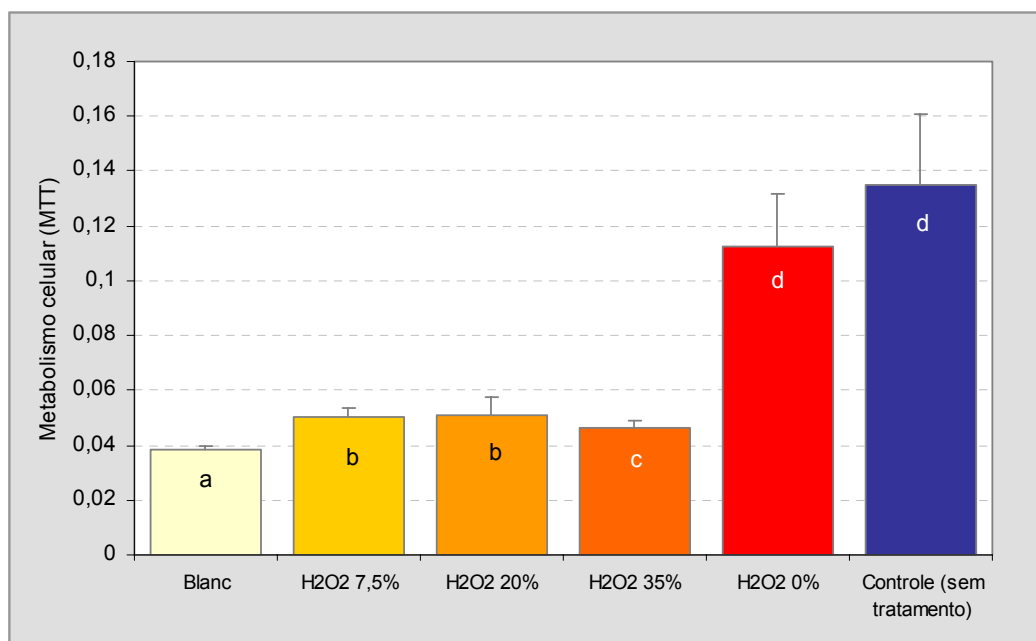


FIGURA 21 - Gráfico de barras representativo das médias do metabolismo celular para cada um dos grupos experimental e controle, FOAr, 2005

\* Letras iguais representam médias estatisticamente semelhantes (Mann-Whitney,  $p \leq 0,05$ )

O teste de correlação aplicado aos dados de permeabilidade dentinária e metabolismo celular resultou num coeficiente de 0,20 ( $p = 0,275$ ), representativo de uma fraca correlação. O gráfico de dispersão dos dados destas variáveis e a respectiva reta de regressão podem ser vistos na Figura 22.

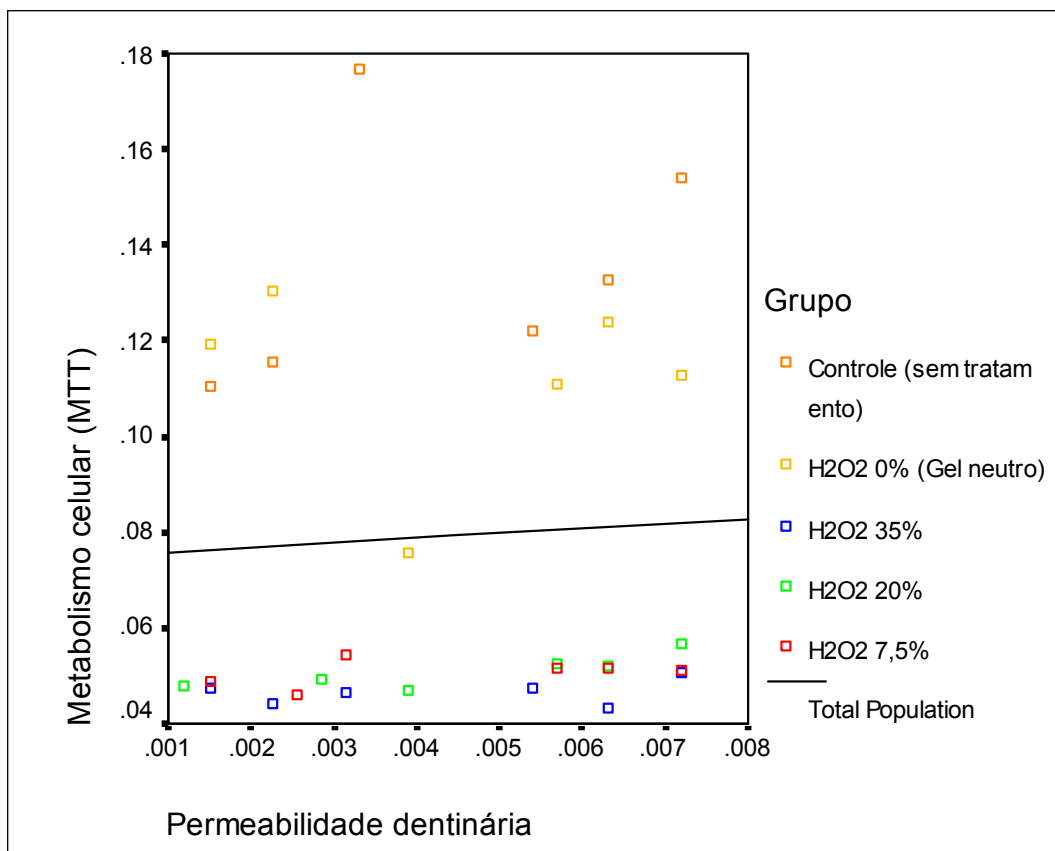


Figura 22 - Gráfico de dispersão dos dados de MTT e permeabilidade dos discos de dentina associado a uma reta de regressão, FOAR, 2005

### 5.3 Análise da morfologia celular e dentinária em microscopia eletrônica de varredura – MEV

#### Grupo 1 – H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 7,5%

O Grupo 1 foi caracterizado por reduzido número de células MDPC-23 que permaneceram aderidas ao disco de dentina. A forma arredondada e achatada foi a característica predominante para a maioria destas células, as quais exibiam

prolongamentos citoplasmáticos praticamente ausentes e células degeneradas com rompimento da membrana citoplasmática (Figuras 23 e 24). A análise da morfologia dentinária nos discos fraturados evidenciou túbulos dentinários dispostos longitudinalmente com discreto aumento na embocadura desses túbulos na interface formada pela superfície oclusal e a área da fratura (Figura 25).

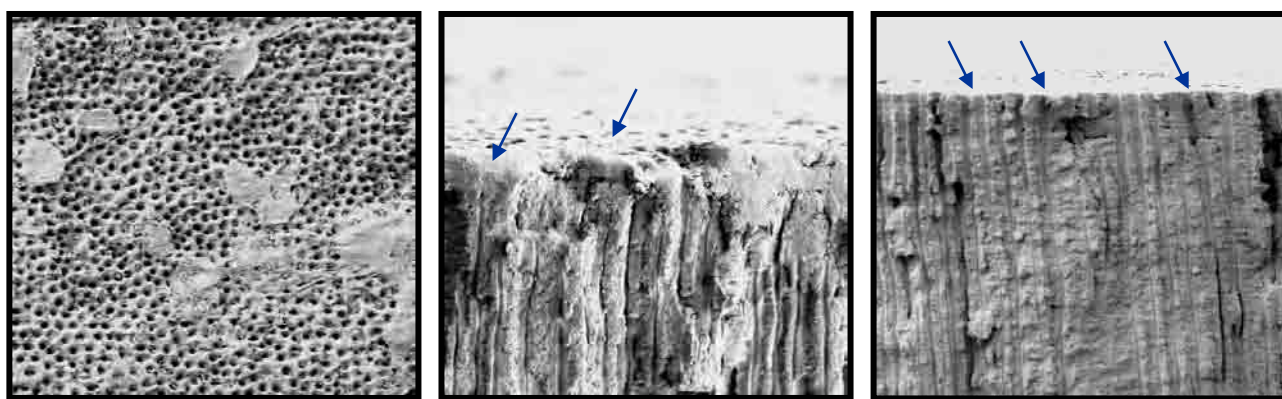


FIGURA 23 – Grupo 1 ( $\text{H}_2\text{O}_2$  7,5%) – Presença de poucas células com morfologia variada aderidas sobre a superfície pulpar do disco de dentina. MEV, 5 KV, X 500.

FIGURA 24 – Grupo 1 ( $\text{H}_2\text{O}_2$  7,5%) – Interface entre a superfície pulpar do disco de dentina e a área fraturada. Observe a superfície fraturada exibindo células com morfologia alterada, as quais se deslocaram da superfície pulpar durante a fratura do disco (setas). MEV, 5 KV, X 1000.

FIGURA 25 – Grupo 1 ( $\text{H}_2\text{O}_2$  7,5%) – Interface entre a superfície oclusal e a área de fratura, expondo longitudinalmente os túbulos dentinários. Observe discreto aumento no diâmetro da embocadura dos túbulos (setas). MEV, 5 KV, X 500.

**Grupo 2 – H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 20%**

Neste Grupo, poucas células permaneceram na superfície pulpar dos discos de dentina. A maioria destas células apresentavam-se em processo de degeneração com restos de citoplasma aderidos à superfície e aos túbulos dentinários (Figuras 26 e 27 - setas). Os túbulos dentinários expostos longitudinalmente na região fraturada mostraram ligeiro aumento na embocadura na interface formada pela superfície oclusal e área da fratura (Figura 28).

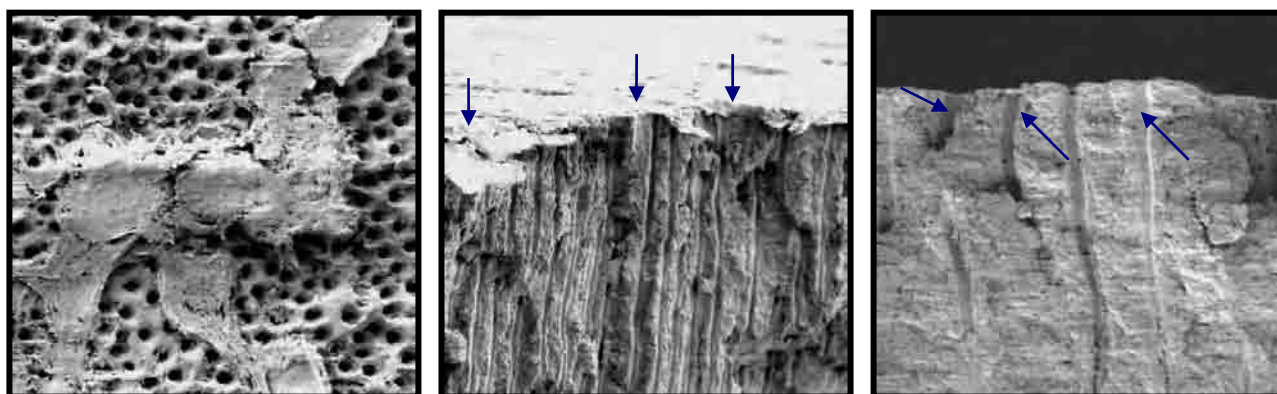


FIGURA 26 – Grupo 2 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 20%) – Presença de poucas células aderidas na superfície pulpar do disco de dentina com citoplasma em degeneração. MEV, 5 KV, X 1000.

FIGURA 27 - Grupo 2 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 20%) – Interface entre a superfície pulpar do disco de dentina e a área fraturada. Note algumas células na região (setas). MEV, 5 KV, X 1000.

FIGURA 28 - Grupo 2 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 20%) – Região fraturada do disco de dentina relacionada com a superfície oclusal. Note um discreto aumento no diâmetro da embocadura dos túbulos dentinários (setas). MEV, 5 KV, X 2000.

### Grupo 3 – H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 35%

A superfície pulpar dos discos de dentina analisados neste grupo apresentou como característica marcante a degeneração celular. Este cenário foi caracterizado pela presença de fragmentos de células mortas e restos de estrutura citoplasmática aderidos à superfície pulpar do disco (Figuras 29 e 30). Já na interface formada pela superfície oclusal do disco e a região fraturada foi observado um significativo aumento na embocadura da maioria dos túbulos dentinários (Figura 31).

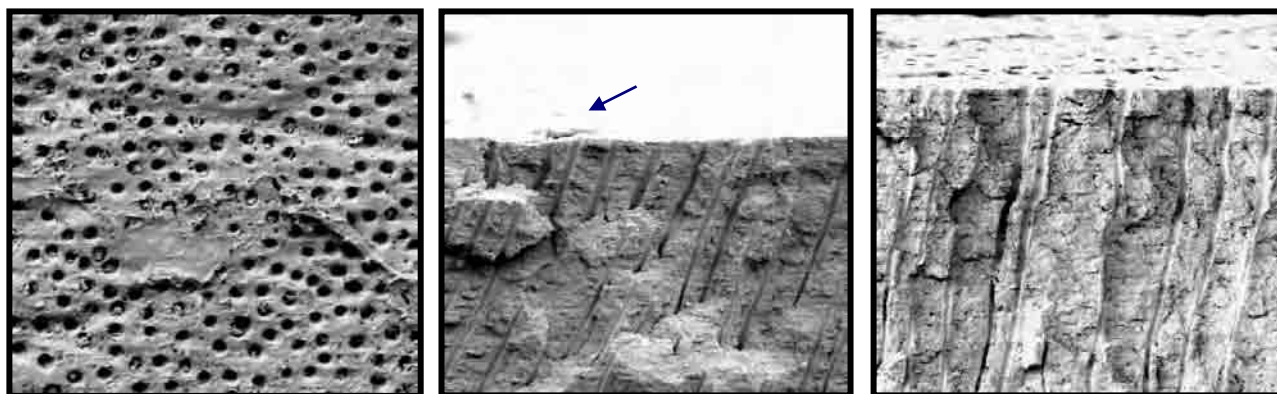


FIGURA 29 - Grupo 3 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 35%) – Superfície pulpar do disco de dentina exibindo fragmentos de células mortas que permaneceram aderidas sobre o substrato. A presença de parte de prolongamentos de células caracteriza que a superfície dentinária estava recoberta por células MDPC-23, as quais se destacaram do local. MEV, 5 KV, X 1000.

FIGURA 30 - Grupo 3 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 35%) – Após a fratura do disco não foi observado deslocamento de células para a superfície fraturada. Apenas uma célula alterada pode ser observada na superfície pulpar do disco (seta). MEV, 5 KV, X 1000.

FIGURA 31 - Grupo 3 ( $H_2O_2$  35%) – além da ampliação do diâmetro dos túbulos dentinários próximo à superfície oclusal pode-se também observar um aumento da embocadura dos túbulos. MEV, 5 KV, X 1000.

#### **Grupo 4 – Gel sem $H_2O_2$**

A superfície pulpar nos discos de dentina do Grupo 4 apresentou recoberta por células com morfologia achatada e prolongamentos citoplasmáticos alongados, ao quais penetravam o interior dos túbulos dentinários (Figuras 32 e 33). Na interface formada pela região fraturada e a superfície pulpar ficou evidente uma grande quantidade de células que se deslocaram no momento da fratura e recobriram a parte dos túbulos dentinários expostos longitudinalmente (Figura 33). Os túbulos dentinários expostos na interface de fratura e a superfície oclusal apresentaram discreto aumento no diâmetro de embocadura (Figura 34).



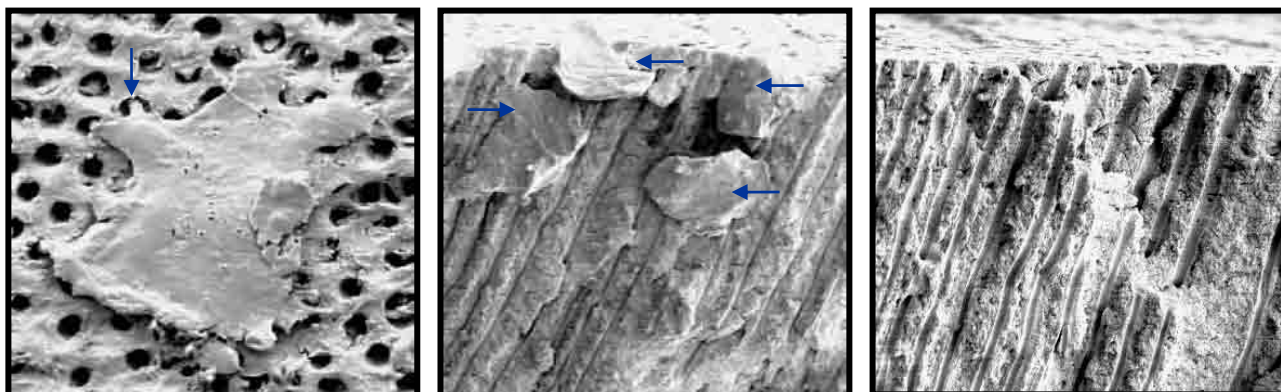


FIGURA 32 – Grupo 4 (Gel sem  $H_2O_2$ ) – Detalhe de uma célula MDPC-23 na superfície do disco de dentina. Note a presença de prolongamento citoplasmático penetrando o túbulo dentinário (seta). MEV, 5 KV, X 2000.

FIGURA 33 - Grupo 4 (Gel sem  $H_2O_2$ ) – Vista da interface entre a superfície pulpar do disco de dentina e a região da fratura. Note a presença de grande quantidade de células que se desprenderam durante a fratura (setas). MEV, 5 KV, X 1000.

FIGURA 34 - Grupo 4 (Gel sem  $H_2O_2$ ) – Interface entre a superfície oclusal tratada com gel sem  $H_2O_2$  e a área fraturada. Note o discreto aumento na embocadura dos túbulos. MEV, 5 KV, X 1000.

### **Grupo 5 – Grupo controle (sem tratamento com agente clareador)**

A superfície pulpar destes discos apresentou maior número de células com características achatadas, cujos prolongamentos citoplasmáticos curtos parecem penetrar no interior dos túbulos para aderi-las ao substrato dentinário (Figuras 35 e 36). Na interface fratura-superfície pulpar foi observado várias células, as quais se deslocaram da superfície pulpar para a área fraturada (Figura 36). Na interface

oposta, formada pela superfície oclusal e região da fratura, foi observado uma discreta ampliação do diâmetro interno dos túbulos dentinários (Figura 37).

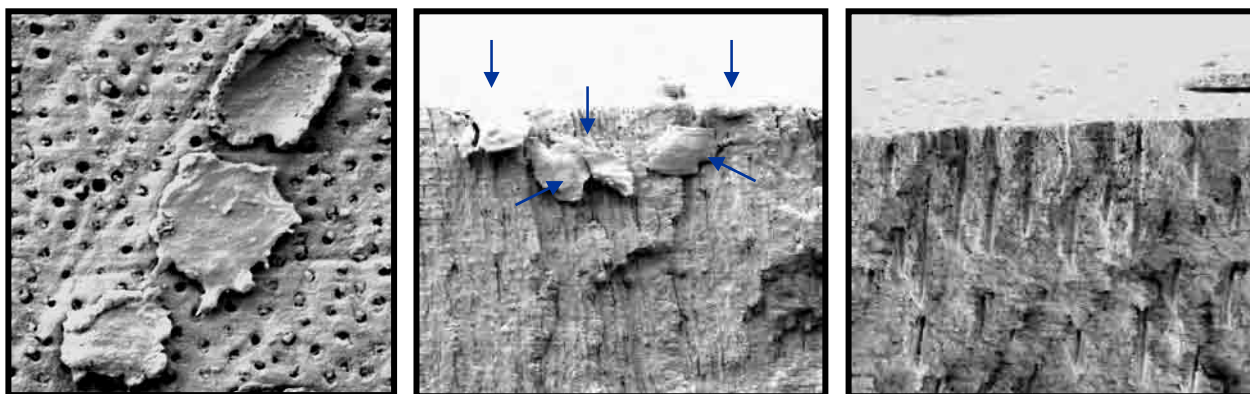


FIGURA 35 – Grupo 5 (Controle) – Células MDPC-23 sobre a superfície da dentina. Note a presença de túbulos dentinários abertos e parcialmente obliterados por restos de prolongamentos citoplasmáticos de células que se destacaram do local. MEV, 5 KV, X 1000.

FIGURA 36 – Grupo 5 (Controle) – Interface entre a superfície pulpar e a área da fratura do disco de dentina. Observe que células se deslocaram para a superfície fraturada (setas). MEV, 5 KV, X 500.

FIGURA 37 – Grupo 5 (Controle) – Interface entre a superfície oclusal sem tratamento com agente clareador e a área fraturada. Observe a discreta ampliação dos túbulos dentinários, sem contudo haver alteração significativa da embocadura. MEV, 5 KV, X 1000.

## **Discussão**

---

## 6 Discussão

O risco que os materiais odontológicos representam para o complexo dentino-pulpar depende da habilidade de se difundirem através da dentina e atingirem a polpa dental (WATAHA et al.<sup>67</sup>, 1994).

Alguns estudos comprovaram a difusão do peróxido de hidrogênio proveniente de agentes clareadores pelos tecidos dentais e determinaram a quantidade deste composto químico capaz de ultrapassar o esmalte e dentina para alcançar a polpa durante os procedimentos de clareamento dental (BENETTI et al.<sup>8</sup>, 2004; BOWLES e UGWENERI<sup>11</sup>, 1987; COOPER et al.<sup>13</sup>, 1992; HANKS et al.<sup>30</sup>, 1993; GOKAY et al.<sup>26</sup>, 2000; THITINANTHAPAN et al.<sup>63</sup>, 1999). Estes estudos *in vitro* testaram diversos agentes clareadores em diferentes condições experimentais, variando suas concentrações e temperatura.

Bowles e Ugweneri<sup>11</sup>, 1987, demonstraram que o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) penetra nos tecidos duros dentais e atinge a câmara pulpar mesmo em baixas concentrações. Os autores determinaram, ainda, que a quantidade de peróxido de hidrogênio dentro da câmara pulpar pode aumentar com a elevação de sua concentração, sendo que para 1%, 10% e 30% os valores foram de 1,8 $\mu$ g; 5,8  $\mu$ g e 25,4 $\mu$ g, respectivamente. Este resultado está em concordância com o estudo realizado mais recentemente por Gokay et al.<sup>26</sup>, 2000; e Benetti et al.<sup>8</sup>, 2004, os quais também concluíram que quanto mais elevada a concentração do agente clareador aplicado sobre a estrutura dentária, maior a penetração do peróxido de hidrogênio no interior da câmara pulpar, especialmente se estes dentes forem

restaurados. Na presente pesquisa, não foi avaliada a concentração do composto ativo (peróxido de hidrogênio) que se difundiu através dos discos de dentina. Todavia, foi possível demonstrar que, independente da concentração deste composto químico incorporado ao gel, houve uma dramática redução no metabolismo das células cultivadas na superfície pulpar dos discos de dentina. O aumento da concentração de peróxido de hidrogênio de 7,5% para 20% não resultou em importante danos às células MDPC-23, com redução no metabolismo celular da ordem de 62,65% e 62,28%, respectivamente, sendo que os dados obtidos não foram estatisticamente diferentes. Por outro lado, o gel com 35% de  $H_2O_2$  (grupo 3) foi o material mais tóxico avaliado na presente pesquisa, onde os valores do metabolismo celular obtidos para este grupo experimental determinou uma redução de 65,69%, sendo esta diferença estatisticamente significativa quando comparada aos grupos 1 e 2. Nas pesquisa de Gokay et al.<sup>26</sup>, 2000 e Benetti et al.<sup>8</sup>, 2004, os agentes clareadores experimentais tiveram que se difundir através do esmalte e dentina para alcançar o espaço pulpar, enquanto na presente pesquisa, os materiais experimentais foram aplicados apenas sobre dentina, a qual é um tecido tubular permeável e que conseqüentemente pode permitir fácil difusão. Assim, apesar das diferentes concentrações de  $H_2O_2$  adicionadas ao agente clareador avaliado nesta pesquisa, todas elas causaram danos celulares, determinando que a variável concentração de  $H_2O_2$  não está diretamente relacionada com a citotoxicidade quando o agente clareador é aplicado sobre dentina. Por outro lado, como demonstrado por Gokay et al.<sup>26</sup>, 2000 e Benetti et al.<sup>8</sup>, 2004, esta relação parece ser direta quando o material é aplicado sobre esmalte, determinando que

quanto maior a concentração de  $H_2O_2$  no agente clareador maior sua capacidade de difundir através do esmalte para alcançar a dentina e então chegar ao espaço pulpar.

No estudo realizado por Gokay et al.<sup>26</sup>, 2000, foi avaliado a penetração do peróxido de hidrogênio em dentes restaurados com três tipos de materiais. Os resultados da pesquisa demonstraram a ocorrência de alta taxa de penetração de peróxido para todos os materiais testados. Todavia, a maior taxa de penetração de peróxido foi encontrada no grupo restaurado com resina modificada por ionômero de vidro (Vitremer), seguido do poliácido modificado por resina (Dyract) e por último o grupo da resina composta (Charisma), onde houve a menor taxa de penetração de peróxido. Os autores sugeriram que a quantidade de penetração pode ser afetada pelo tipo de material restaurador e que esta penetração é amplificada devido às propriedades do material restaurador com relação à microinfiltração marginal. Estes achados parecem caracterizar que quanto maior a possibilidade do agente clareador atingir a dentina, maior sua possibilidade de difusão para alcançar o espaço pulpar e causar danos celulares no local. Assim baseado na presente pesquisa e em dados científicos obtidos de investigações anteriores, a aplicação de agente clareador que contenha  $H_2O_2$  em sua composição sobre estrutura dentinária exposta deve ser cuidadosamente reavaliada.

Numa pesquisa recente, Benetti et al.<sup>8</sup>, 2004, utilizaram dentes bovinos intactos, os quais foram restaurados com Scotchbond Multipurpose (3M Dental Products) e resina composta Durafill (Heraeus Kulzer). Foi demonstrado que a maior penetração de peróxido dentro da câmara pulpar foi encontrada nos dentes

restaurados expostos ao peróxido de carbamida 35% ( $0,7897 \pm 0,3003\mu\text{g}$ ), seguido pelos dentes restaurados expostos ao peróxido de carbamida 10% ( $0,2954 \pm 0,2354\mu\text{g}$ ) e dentes intactos expostos ao peróxido de carbamida 35% ( $0,1310 \pm 0,0579\mu\text{g}$ ). Os dentes intactos submetidos à exposição com peróxido de carbamida 10% não mostrou ser estatisticamente diferente dos dentes não tratados (grupo controle), sugerindo, desta forma, que baixas concentrações de peróxido podem ser usadas com segurança em dentes restaurados. Por outro lado, Cooper et al.<sup>13</sup>, 1992 e Thitinantapan et al.<sup>63</sup>, 1999, afirmaram que a difusão do peróxido de hidrogênio através da coroa dental não é proporcional à concentração do agente químico aplicado, o qual parece estar associado aos componentes do produto. No estudo de Cooper et al.<sup>13</sup>, 1992, foi testado o peróxido de carbamida nas concentrações de 10% e 15% e peróxido de hidrogênio 5% e 30% por 15 minutos a 37°C em dentes humanos extraídos. Os resultados mostraram que a quantidade de peróxido de hidrogênio encontrada no interior da câmara pulpar nos grupos submetidos ao peróxido de carbamida 10% e 15% foi de 3,3 $\mu\text{g}$  e 4,8 $\mu\text{g}$ , respectivamente. Os outros dois grupos que foram expostos ao peróxido de hidrogênio 5% e 30% tiveram um resultado de 10,4 $\mu\text{g}$  e 40,4 $\mu\text{g}$ , respectivamente. Os autores compararam o grupo experimental exposto ao peróxido de carbamida 15% com o grupo exposto ao peróxido de hidrogênio 5%. Esta comparação foi justificada pelo fato de que o peróxido de carbamida 15% possui um equivalente de peróxido de hidrogênio em torno de 5,25%. Assim sendo, uma menor quantidade de peróxido de hidrogênio atingiu a polpa através do peróxido de carbamida (4,8 $\mu\text{g}$ ) do que através do peróxido de hidrogênio livre a 5% (10,4 $\mu\text{g}$ ).

Desta forma, os autores concluíram que a difusão do peróxido de hidrogênio através da coroa dental é de alguma forma limitada e que a taxa de difusão não é proporcional à concentração do peróxido de hidrogênio e sim pelos componentes do produto. Dentro deste contexto, Thitinantapan et al.<sup>63</sup> no ano de 1999, testaram três marcas comerciais diferentes de peróxido de carbamida, todos na concentração de 10% (Opalescence, Sparkle, e Rembrandt). Os autores demonstraram valores diferentes na difusão dos produtos testados, sendo que a quantidade média de peróxido de hidrogênio medida foi:  $3,605 \pm 1,405\mu\text{g}$  (Opalescence);  $1,282 \pm 0,762\mu\text{g}$  (Sparkle); e  $0,339 \pm 0,251\mu\text{g}$  (Rembrandt). A significativa diferença estatística entre os grupos levou os autores à concluir que a penetração do peróxido de hidrogênio para a polpa dental varia significativamente em vários produtos comerciais, embora estes produtos apresentem a mesma concentração de peróxido. Foi relatado também que esta diferença pode estar associada a quantidade de carbopol (carboxypolyethylene polymer) no produto, uma vez que este composto é adicionado ao material na forma comercial com o objetivo de aumentar a viscosidade e retardar a liberação do peróxido de hidrogênio. De acordo com estas pesquisas, pode-se especular que o peróxido de hidrogênio apresenta alta capacidade de difusão através das estruturas dentárias, sendo que outros componentes podem alterar esta sua propriedade interessante no processo de clareamento, porém indesejada em termos de biocompatibilidade. Desta maneira, na presente pesquisa diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio foram incorporadas ao gel base (grupos 1, 2, e 3), sendo que este gel sem  $\text{H}_2\text{O}_2$  também foi avaliado isoladamente (grupo



4), com o objetivo de determinar se a adição de outros componentes, além do peróxido de hidrogênio, poderia ser responsável pela difusão transdentinária e possível efeito tóxico sobre as células de linhagem odontoblástica. Assim, foi demonstrado que para o gel sem  $H_2O_2$  (Grupo 4) ocorreu discreta redução no metabolismo celular (17,09%), caracterizando que este produto não apresenta forte capacidade de difusão através da dentina e/ou a concentração de seus componentes que se difundiram através da dentina não é suficientemente capaz de causar efeitos tóxicos sobre as células em cultura. Estes achados demonstraram que mesmo baixas concentrações de  $H_2O_2$  adicionadas no gel base, tal como 7,5%, transformam este gel de baixa citotoxicidade transdentinária, num material com alto potencial citopático. Assim, pode-se sugerir que o principal componente químico tóxico presente na composição do agente clareador avaliado na presente pesquisa é o peróxido de hidrogênio.

Outro importante fator que parece ter relação direta com o aumento da difusão dos agentes clareadores para a polpa dental é o calor (BOWLES e UGWENERI<sup>11</sup>, 1987). O peróxido de hidrogênio e o calor são dois componentes importantes que fazem parte da técnica comumente usada no clareamento dental realizado em consultório odontológico. O calor é aplicado com a finalidade de acelerar a reação química do peróxido de hidrogênio com as estruturas dentárias. Dentro deste contexto, Bowles e Ugweneri<sup>11</sup>, 1987, estudaram a difusão do peróxido de hidrogênio 10% por 15 minutos em dentes humanos hígidos extraídos. Os autores evidenciaram a ocorrência de significativo aumento na quantidade de peróxido de hidrogênio que se difundiu para dentro da câmara

pulpar quando se realizou a elevação da temperatura, sendo de 9,3µg à 37°C e 25,5 µg à 50°C. Em estudo anterior, realizado em 1976 por Outhwaite et al.<sup>47</sup>, o aumento na temperatura de 25°C para 35°C (variação de 10°C), praticamente dobrou a taxa de permeabilidade ao <sup>125</sup>I em discos de dentina obtidos de terceiros molares humanos. Na presente pesquisa, não foi realizada a associação da aplicação de calor com o gel clareador. Todavia, foi evidente que nos grupos onde havia peróxido de hidrogênio incorporado no gel, ocorreu importante efeito tóxico do material sobre as células. Assim, pode-se especular que a aplicação de calor sobre o material dispensado sobre o disco de dentina poderia exacerbar o efeito tóxico do agente clareador avaliado, caracterizando que esta técnica poderia causar danos celulares importantes. Conseqüentemente, pesquisas *in vitro* associando calor e aplicação de gel clareador serão importantes para esclarecer esta questão. Todavia, com o objetivo de complementar estes estudos de associação de agente clareador com a aplicação de calor, algumas pesquisas foram realizadas *in vivo* (dentes humanos e de animais), com posterior avaliação histológica das condições do tecido pulpar (COHEN e CHASE<sup>12</sup>, 1979; ROBERTSON e MELFI<sup>54</sup>, 1980; SEALE et al.<sup>56</sup>, 1981). Assim, a análise dos cortes histológicos do tecido pulpar de dentes pré-molares humanos submetidos ao clareamento com peróxido de hidrogênio 35% associado à aplicação de calor (46°C a 53°C), não demonstraram evidências de alterações teciduais significantes (COHEN e CHASE<sup>12</sup>, 1979). Neste estudo, Cohen e Chase<sup>12</sup>, realizaram três sessões de 30 minutos de clareamento dental com intervalos de 24 horas entre as sessões. Os dentes tratados foram extraídos em três diferentes períodos pós-

operatórios: uma hora, 15 e 30 dias após o tratamento clareador. Embora a sensibilidade dental ou dor espontânea pós-operatória tenha sido relatada por 73% dos pacientes, sua duração não ultrapassou 24 horas. A análise histopatológica mostrou que as condições pulpares dos grupos experimentais foram coerentes com o grupo controle (dentes não tratados) em todos os tempos pós-operatórios analisados e a camada de odontoblastos estava intacta. Por outro lado, Robertson e Melfi<sup>54</sup>, 1980, encontraram alterações pulpares em dentes submetidos ao clareamento dental com peróxido de hidrogênio 35% associado ao calor. Os autores avaliaram histologicamente a resposta pulpar em dentes humanos hígidos submetidos à aplicação de duas sessões de 5 minutos de peróxido de hidrogênio na concentração de 35%, associado ou não à aplicação de calor, o qual variava de 46°C a 51°C. Embora nesta pesquisa o tempo de exposição tenha sido de apenas 5 minutos, as avaliações histológicas destes dentes revelaram discreta resposta inflamatória limitada no tecido pulpar superficial dos dentes submetidos ao tratamento de calor associado ao peróxido de hidrogênio. O calor ou o peróxido de hidrogênio utilizados isoladamente não causaram significativa resposta inflamatória quando comparados com o grupo controle. A avaliação comparativa entre as pesquisas realizadas em dentes humanos parece problemática, desde que os autores seguiram protocolos diferentes quanto à técnica de aplicação, tempo e temperatura. Todavia, está evidente que o aumento da temperatura realizado para favorecer e acelerar o clareamento dental, pode levar a danos ao tecido pulpar em períodos curtos de avaliação. Todavia, as discretas respostas iniciais da polpa se resolvem com o decorrer do tempo. Estes resultados observados em pesquisas

realizadas em dentes de seres humanos se contrapõem àquelas realizadas em dentes de animais. Este fato pode ser comprovado através da análise crítica da pesquisa realizada em dentes de cães por Seale et al.<sup>56</sup>, 1981. O tratamento realizado pelos pesquisadores consistiu de 4 aplicações de 30 minutos de peróxido de hidrogênio 35% e/ou calor (62°C) com intervalos de 1 semana entre as aplicações. As extrações foram realizadas nos períodos de 3, 15 e 60 dias após terminado o tratamento. Os resultados mostraram que 3 e 15 dias após o tratamento havia resposta inflamatória intensa na polpa coronária dos dentes dos cães, com destruição dos odontoblastos, ausência de pré-dentina não calcificada, denso infiltrado inflamatório e áreas de erosão da dentina, sugestivas de reabsorção interna. Estes resultados foram semelhantes para os dentes tratados com o peróxido de hidrogênio isoladamente e peróxido de hidrogênio associado ao calor. No entanto, estas intensas alterações pulpares iniciais apresentaram evidências de reversibilidade após 60 dias. Já nos dentes tratados apenas com calor, os exames histológicos não evidenciaram reações adversas nas polpas. Esta variação na característica e intensidade da resposta do complexo dentino-pulpar de acordo com os espécimes (dentes de animais e seres humanos) tem sido intensamente discutido na literatura (COSTA et al.<sup>19</sup>, 2003). Também, resultados de pesquisas *in vitro* têm colaborado para se estudar os mecanismos de ação de materiais dentários em suas diferentes características. Os dados científicos obtidos destas pesquisas realizadas em laboratório não podem ser extrapolados, de imediato, para condições clínicas, especialmente em seres humanos. Todavia, os testes *in vitro* são utilizados para comparar condições de aplicação de materiais e

predizer sua segurança de trabalho. Por este motivo, estes testes de citotoxicidade *in vitro* têm sido recomendados pela FDI, ISO, ANSI/ADA e outras federações e associações responsáveis pela standardização dos testes de propriedades biológicas de novos materiais e técnicas, como testes iniciais, os quais são necessários para que possa dar seqüência aos testes *in vivo* com animais de experimentação. Desta maneira, os resultados obtidos na presente pesquisa determinaram que cuidados devem ser tomados quando da aplicação de agentes clareadores que contêm H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em sua composição, especialmente em casos de exposição de dentina. Por outro lado, quando o clareamento dental é realizado em dentes íntegros, com aplicação dos agentes clareadores sobre estrutura de esmalte, como demonstrado por Schulte et al.<sup>55</sup>, 1994, González-ochoa<sup>28</sup>, 2002, e Anderson et al.<sup>3</sup>, 1999, este procedimento operatório pode ser considerado seguro para a polpa dental, e que as pequenas alterações pulpares causadas em períodos iniciais são reversíveis dentro de duas semanas após o término do clareamento.

Alguns estudos avaliando a citotoxicidade dos agentes clareadores foram realizadas *in vitro*, em cultura de células (BOWLES e THOMPSON<sup>10</sup>, 1986; BOWLES e BURNS Jr.<sup>9</sup>, 1992; HANKS et al.<sup>30</sup>, 1993.; WOOVERTON et al.<sup>68</sup>, 1993; KOULAOUZIDOU et al.<sup>40</sup>, 1998; AREN<sup>4</sup>, 2003; KANNO et al.<sup>37</sup>, 2003). Dentre os variados protocolos de pesquisa recomendados para estudar de maneira geral os materiais dentários, os testes de citotoxicidade em cultura de células têm sido amplamente empregados para avaliar os efeitos provocados por uma concentração específica do agente, seja danificando componentes, estruturas ou passos bioquímicos dentro das células (WATAHA<sup>67</sup>, 1994).

Bowles e Thompson<sup>10</sup>, 1986, avaliaram, em nível molecular, o efeito do peróxido de hidrogênio e calor (50°C), individualmente e em conjunto sobre sete enzimas presentes no tecido pulpar de dentes bovinos, as quais estão diretamente envolvidas no metabolismo de glicose e aminoácidos. Os autores relataram que quase todas as enzimas sofreram certo grau de inibição pelo peróxido de hidrogênio em baixas concentrações (2,5% e 5%). O peróxido de hidrogênio na concentração de 15% (maior concentração avaliada), foi capaz de aumentar a taxa de inibição da atividade enzimática para todas as enzimas testadas. Os resultados indicaram que o calor isoladamente (50°C), ou seja cerca de 13°C acima da temperatura pulpar fisiológica, apresenta pouco efeito sobre as enzimas pulpares avaliadas. Contudo, no tratamento combinado, calor e peróxido de hidrogênio, até mesmo sob condição mais amena (peróxido de hidrogênio 2,5% e 50°C por 7,5 min.), ocorreu total inibição de duas enzimas (G6-PDH e isocitrato desidrogenase), e redução substancial da atividade de várias outras. Os autores concluíram que as enzimas pulpares são significativamente inibidas pelo peróxido de hidrogênio *in vitro* principalmente quando associado ao calor, e afirmaram que estes dados sugerem que a combinação de calor e peróxido de hidrogênio tem um potencial para danos biológicos aos tecidos pulpares. Apesar de não ser recomendado que dados científicos obtidos através do desenvolvimento de pesquisas *in vitro* sejam diretamente extrapolados para situações clínicas (COSTA et al.<sup>16</sup>, 2001), pesquisas em cultura de células, como esta realizada por Bowles e Thompson<sup>10</sup>, em 1986, parecem colaborar no esclarecimento dos mecanismos pelos quais componentes de agentes clareadores interagem com células e como

estes agentes químicos desencadeiam respostas inflamatórias e/ou induzem apoptose ou morte celular *in vivo*. Isto porque, como demonstrado na presente pesquisa e em investigações anteriores, componentes de agentes clareadores podem se difundir através das estruturas dentárias para atingir o tecido pulpar. Em situações clínicas específicas onde há exposição da dentina, tal como em pacientes com recessões gengivais, abfrações, erosões, áreas de desgastes por atrito, defeitos do esmalte ou da junção cimento-esmalte e infiltrações marginais em restaurações, a polpa parece se tornar mais vulnerável aos efeitos tóxicos dos componentes químicos ativos dos agentes clareadores. De acordo com Hanks et al.<sup>30</sup>, 1993, quando peróxidos são aplicados diretamente sobre dentina, onde há grande presença de túbulos dentinários, existe uma maior probabilidade de danos pulpares, particularmente devido à maior permeabilidade da dentina exposta. Preocupados com a inadvertida exposição da dentina aos agentes clareadores dentais de uso caseiro, Hanks et al.<sup>30</sup>, 1993, realizaram uma série de três experimentos, sendo que no primeiro deles foi estabelecida a dose inibitória de peróxido de hidrogênio para a atividade da enzima succinyl dehydrogenase de células Balb/c 3T3 cultivadas *in vitro* em 1 e 6 horas. O valor inibitório (ID<sub>50</sub>) foi de aproximadamente 0,58mmol/L para 1 hora e 0,44mmol/L para 6 horas de contato do peróxido com as células cultivadas. Os autores observaram também que a atividade enzimática das células era suprimida com o aumento do tempo e da concentração de peróxido de hidrogênio. Na presente pesquisa, apesar de não ter sido realizado variações no tempo de aplicação do peróxido de hidrogênio sobre os discos de dentina, o curto período de exposição da dentina aos materiais

experimentais determinou um notável efeito citotóxico sobre as células em cultura. Assim, pode-se especular que, tal como a aplicação de calor, o aumento do tempo de aplicação do  $H_2O_2$  sobre a dentina poderia exacerbar o efeito citopático do agente clareador experimental em suas diferentes concentrações. No segundo experimento, os pesquisadores utilizaram um dispositivo simulador de câmara pulpar para determinar a quantidade de peróxido de hidrogênio capaz de se difundir através de um disco de dentina de 0,5 mm de espessura, após a aplicação de cinco marcas comerciais de agentes clareadores (BriteSmile – PH 10%; BriteSmile – PH 3%; Denta-Lite – PC 10%; Dentsbrite – PC 10%; Rembrandt Lighten – PC 10%; Union Broach Nu-Smile – PC 15%). Todos os produtos testados apresentaram difusão do peróxido de hidrogênio entre 1 e 6 horas, sendo que após 6 horas todos haviam excedido a dose inibitória pré-estabelecida. Na presente pesquisa, um sistema simulador de câmara pulpar também foi utilizado, no qual um disco de dentina de 0,5mm foi acoplado, tal como descrito por Hanks et al.<sup>30</sup>, 1993. Assim como demonstrado pelos pesquisadores quando diferentes agentes clareadores comerciais à base de peróxido de hidrogênio foram aplicados sobre discos de dentina, na presente pesquisa o agente clareador causou sérios danos celulares, caracterizando que componentes deste material se difundiram através da dentina e certamente excederam a dose inibitória mínima para as células MDPC-23. Apesar de não ter sido determinado especificamente qual componente do agente clareador atingiu a superfície pulpar do disco de dentina, causando lesão celular, pode-se especular, baseado no grupo 4 (gel sem  $H_2O_2$ ), que a adição de peróxido de hidrogênio no gel foi o fator



principal que desencadeou o efeito citotóxico, sugerindo que este componente químico é o responsável pelos efeitos adversos causado pelo agente clareador experimental sobre as células. Isto também pode ser corroborado pela análise em microscopia eletrônica de varredura realizada na presente pesquisa para avaliar a morfologia celular das células MDPC-23, onde ficou evidente a diferença entre as células dos grupos experimentais e controle. O grupo 5 (controle) e o grupo 4 (gel sem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) apresentaram maior número de células com integridade morfológica caracterizadas por um formato plano e alongado. As amostras dos grupos experimentais 1, 2 e 3, submetidos ao tratamento clareador com peróxido de hidrogênio 7,5%, 20% e 35%, respectivamente, mostraram áreas de intensa destruição celular. Células desintegradas e/ou descoladas formaram um cenário caracterizado pela presença de restos celulares e fragmentos de prolongamentos citoplasmáticos que permaneceram aderidos à superfície dos discos e dos túbulos dentinários. Esta característica pode ser atribuída ao caráter tóxico do peróxido de hidrogênio que se difundiu pelos túbulos dentinários do disco de dentina e atingiu a superfície pulpar danificando as células MDPC-23. No terceiro experimento, os autores avaliaram a citotoxicidade do peróxido de hidrogênio para células Balb/c 3T3 (fibroblastos) cultivadas *in vitro* onde relataram que em menos de 1 hora todos os produtos causaram efeitos citotóxicos definidos sobre as células. Os outros fatores testados, como a osmolaridade, permeabilidade da dentina e o pH dos agentes clareadores não mostraram correlacionamento positivo com a citotoxicidade dos materiais testados sobre os fibroblastos Balb/c 3T3. Na presente pesquisa, os testes de permeabilidade determinaram que não havia

diferença estatisticamente significativa entre os grupos experimentais e controle. Todavia, foi determinado que os discos de dentina apresentavam variados valores individuais de permeabilidade, sendo que, tal como relatado por Hanks et al.<sup>30</sup>, 1993, os efeitos citotóxicos observados sobre as células em cultura não estavam diretamente correlacionados com os valores de permeabilidade dos discos de dentina. Hanks et al.<sup>30</sup> também observaram que os valores de condutância hidráulica ( $L_p$ ) para os discos de dentina antes e após o experimento não variaram mais que 15%, sugerindo que a permeabilidade não foi alterada pelo peróxido de hidrogênio ou pelos agente clareadores. No entanto, na presente pesquisa pudemos verificar que muitos túbulos dentinários dos discos utilizados nos grupos experimentais 1, 2 e 3 ( $H_2O_2$  7,5%, 20% e 35%, respectivamente) analisados em microscopia eletrônica de varredura apresentaram um ligeiro aumento no diâmetro da embocadura próximo à área de interface formada pela fratura e a superfície oclusal (superfície tratada com agente clareador). Isto sugere uma alteração nos túbulos provocados pelo peróxido de hidrogênio. Porém, neste trabalho a condutância hidráulica não foi realizada após o tratamento clareador, portanto não foi possível verificar se esta alteração na morfologia tubular seria capaz de alterar a permeabilidade dentinária pós-tratamento para os agentes clareadores utilizados neste trabalho. Pesquisas futuras necessitam ser realizadas para a verificação desta hipótese.

Apesar da avaliação da citotoxicidade de um determinado material não corresponder diretamente aos dados científicos obtidos em outros estudos com o mesmo material devido aos diferentes tipos de células utilizadas, variados

períodos de incubação e/ou diferentes condições experimentais, parece claro que baixas concentrações de agentes clareadores apresentam intenso efeito citotóxico sobre diferentes linhagens celulares. Isto pode ser comprovado pela pesquisa desenvolvida por Koulaouzidou et al.<sup>40</sup>, 1998, os quais analisaram *in vitro* a citotoxicidade do agente clareador com peróxido de uréia (Colgate Platinum) e do peróxido de hidrogênio, aplicados sobre duas linhagens de células L929 e BHK21/C13. Nas culturas contendo tanto o peróxido de uréia quanto o peróxido de hidrogênio, houve queda na densidade celular, confirmando o efeito citotóxico de ambos agentes clareadores, os quais mostraram efeito dose-dependente e também tempo-dependente na viabilidade celular. Para a linhagem de células L929, a concentração de peróxido de hidrogênio capaz de causar inibição em 50% no número de células (ID<sub>50</sub>) foi de 0,00034% (0,0997mmol/L) após 24 horas, e 0,00001% (0,0029mmol/L) após 72 horas. Para a linhagem BHK21/C13 os valores foram de 0,00016% (0,0469mmol/L) após 24 horas e 0,00007% (0,0205 mmol/L) após 72 horas de incubação. A dose inibitória (ID<sub>50</sub>) para o agente Colgate Platinum em células L929 foi de 0,00074% após 24 horas e 0,00045% após 72 horas e para a linhagem BHK21/C13 foi de 0,00055% e 0,00024%, após 24 e 72 horas respectivamente. As duas linhagens de células utilizadas neste estudo apresentaram diferenças com relação à sensibilidade aos agentes testados, sendo que as células BHK21/C13 foram mais sensíveis aos agentes clareadores do que as células L929. Na presente pesquisa, células de linhagem odontoblástica MDPC-23 foram utilizadas para avaliar os efeitos citotóxicos do agente clareador com diferentes concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. De acordo com Hanks (informação

pessoal), células especializadas, tais como as MDPC-23 são mais sensíveis do que fibroblastos em cultura. Conseqüentemente, as doses inibitórias ( $ID_{50}$ ) determinadas por Koulaouzidou et al.<sup>40</sup>, 1998, para as células L929 e BHK21/C13, poderiam apresentar valores menores para as células utilizadas na presente pesquisa, caracterizando a alta sensibilidade destas células odontoblastóides ao peróxido de hidrogênio.

Wooverton et al.<sup>68</sup>, em 1993, avaliaram a citotoxicidade *in vitro* promovida por dois agentes clareadores contendo peróxido de carbamida 10%, com adição de carbopol (Proxigel) ou não (Gly-Oxide) sobre fibroblastos de ratos (L929) em cultura. Os autores também compararam os resultados obtidos para estes materiais experimentais com os efeitos citotóxicos causados por outros sete produtos odontológicos de uso geral. Os resultados mostraram que houve 50% de morte celular ( $ID_{50}$ ) em concentração de 0,62mmol/L para o peróxido de carbamida sem carbopol e 1,88 mmol/L para o peróxido de carbamida com carbopol. Nas comparações de citotoxicidade realizada entre os dois agentes clareadores e os sete materiais odontológicos, os autores puderam concluir que os dois peróxidos de carbamida testados não se mostraram mais tóxicos que os outros materiais odontológicos. Estes resultados *in vitro* estão de acordo com pesquisas desenvolvidas *in vivo* (SCHULTE et al.<sup>55</sup>, 1994, GONZÁLEZ-OCHOA<sup>28</sup>, 2002; ANDERSON et al.<sup>3</sup>, 1999). Assim, parece que a adição de carbopol ao agente clareador protege o tecido pulpar contra o possível efeito tóxico de outros componentes químicos presentes nos materiais empregados no clareamento, mesmo quando da associação com o calor. Assim, pode-se sugerir que a adição de

carbopol no gel avaliado na presente pesquisa, talvez pudesse reduzir os efeitos tóxicos sobre as células, desde que o carbopol é adicionado aos agentes clareadores para aumentar sua viscosidade e retardar a liberação do  $H_2O_2$  (THITINANTHAPAN et al.<sup>63</sup>, 1999). Desta maneira, pode-se especular que o tempo de aplicação de 30 minutos de agente clareador em diferentes concentrações sobre os discos de dentina não seria suficiente para ocasionar efeito citopático intenso como demonstrado na presente pesquisa.

Além do efeito inibitório do peróxido de hidrogênio sobre as enzimas do tecido pulpar, Kanno et al.<sup>37</sup>, 2003, também mostrou *in vitro* que o peróxido de hidrogênio 30% (30 $\mu$ M) produziu estresse oxidativo, causou citotoxicidade, apoptose e genotoxicidade sobre células P388. Em complementação, os autores examinaram também um anti-oxidante natural (Naringin), um bioflavonóide encontrado em frutas cítricas, e avaliaram suas propriedades protetoras (antioxidantes e anti-apoptóticas) para estas células. Quando as células foram pré-tratadas por 15 minutos com o antioxidante Naringin ou a GSH (forma reduzida da glutathione, que é um típico antioxidante intracelular), houve redução na citotoxicidade celular e além disso, os danos ao DNA foram suprimidos. Os autores sugeriram que a provável causa desta proteção celular está relacionada à capacidade inibidora de apoptose que este antioxidante natural promove. Assim, agentes químicos clareadores poderiam causar danos celulares por ação oxidante direta sobre as membranas celulares. Isto poderia sugerir a inclusão de complemento vitamínico ou administração de drogas antioxidantes para pacientes que serão submetidos ao clareamento dental. Todavia, escassas são as pesquisas

nesta área, sendo que investigações *in vivo* são necessárias para comprovar ou não os dados obtidos *in vitro*. Numa destas pesquisas *in vivo*, Anderson et al.<sup>3</sup>, 1999, investigaram a presença da enzima Heme oxigenase-1 (HO-1; Heat Shock Protein 32 – HSP32) em dentes tratados com peróxido de carbamida 10% por 4 horas imediatamente antes das extrações. O aumento da HO-1 é uma reação de defesa contra os efeitos dos radicais livres, tal como o peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). As análises imunohistoquímicas para a HO-1 mostraram um resultado positivo para os odontoblastos adjacentes à superfície clareada. Os fibroblastos pulpares, células mesenquimais indiferenciadas localizados mais interiormente na polpa e porção radicular, mostraram resultado imunohistoquímico negativo. Estes dados científicos levaram os autores a sugerirem que odontoblastos localizados na polpa coronária e células endoteliais subjacentes, podem ter um potencial para responder à estresse oxidativo através do aumento da síntese de HO-1 (HSP32), sendo que este evento pode representar um componente inicial da resposta de defesa mediada por células específicas em locais estratégicos na polpa, precedendo o clássico trajeto inflamatório.

A catalase e a peroxidase são duas enzimas conhecidas pela capacidade de degradar o peróxido de hidrogênio. A peroxidase utiliza o peróxido de hidrogênio para oxidar outros substratos, enquanto a catalase quebra o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio. No entanto, Bowles e Burns<sup>9</sup>, 1992, mostraram *in vitro* que a polpa dental apresenta falta de atividade das enzimas catalase e peroxidase. A atividade da enzima catalase encontrada no extrato pulpar foi de apenas  $2 \times 10^{-2}$   $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  de tecido. Os autores afirmaram que esta taxa foi

muito baixa quando comparada com a taxa padrão da catalase que é de  $10^5$   $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ . A taxa da atividade da glutathione peroxidase foi determinada como ausente no extrato pulpar analisado. Os autores justificaram que o extrato de polpas dos dentes extraídos exibiu baixa retenção de sangue e que isto poderia influenciar na atividade enzimática. Contudo, durante a inflamação, uma maior quantidade de volume sanguíneo flui para o interior da polpa, podendo contribuir para uma maior atividade da peroxidase. Além disso, a polpa dental apresenta esparsa população celular composta principalmente por fibroblastos, com um amplo volume de tecido conjuntivo extracelular, o qual pode contribuir para a baixa atividade enzimática.

Os resultados dos estudos de citotoxicidade *in vitro* são mais previsíveis para riscos associados com efeitos tóxicos quando as concentrações testadas correspondem com as utilizadas *in vivo*, em tecidos ou aplicações locais. Contudo, certas limitações dos testes de citotoxicidade *in vitro* precisam ser reconhecidas ao se elaborar um estudo e interpretar os seus resultados. Existem diferenças substanciais, incluindo muitos parâmetros fisiológicos e bioquímicos, entre o ambiente de cultura celular e todo o sistema animal, *in vivo*. Os processos metabólicos em sistemas animais são mais complexos e dinâmicos que os processos em cultura de células (LI<sup>43</sup>, 1996). Além disso, quando um agente é adicionado em cultura, ele está prontamente disponível para as células, o que pode não ocorrer em sistemas vivos. Um exemplo seria a interação de uma substância com a barreira de dentina, interagindo com seus componentes antes de atingir as células da polpa dental.

A dentina é um tecido capaz de sequestrar ou se ligar à uma variedade de substâncias que se deslocam através dos túbulos dentinários, como por exemplo, os íons hidrogênio e muitas proteínas tais como albumina e fibrinogênio, os quais podem provocar diminuição na permeabilidade dentinária por obliteração tubular (PASHLEY<sup>49</sup>, 1988). É importante entender que um material tido como altamente citotóxico *in vitro* pode não impor significativo risco ao tecido, órgão ou corpo, ou seja, o risco pode ser reduzido devido à difusão ou diluição dos componentes através de barreiras biológicas (PASHLEY<sup>49</sup>, 1988), tempo insuficiente de contato dos componentes com os tecidos (WATAHA et al.<sup>67</sup>, 1994) e sistemas de defesa do organismo (KANNO et al.<sup>37</sup>, 2003; ANDERSON et al.<sup>3</sup>, 1999; BOWLES e BURNS<sup>9</sup>, 1992). Existem pelo menos duas forças que podem dificultar a difusão do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> proveniente de agentes clareadores para o interior da polpa: a pressão interna pulpar positiva e a pressão osmótica dos agentes clareadores (MATTHEWS e PASHLEY<sup>45</sup>, 1992). A pressão interna pulpar, estimada em 15 cm de H<sub>2</sub>O (SUDA e IKEDA<sup>59</sup>, 2002) pode trabalhar contra a difusão do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para o interior da câmara pulpar, assim como a osmolaridade do agente clareador ter a tendência em tirar fluido do interior da polpa. Contudo, Hanks et al.<sup>30</sup>, 1993 afirmaram que a osmolaridade dos agentes clareadores parece ser controlada mais pela composição dos agentes clareadores do que concentração do peróxido e mostraram que a osmolaridade não teve efeito significativo na taxa de difusão do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. No presente estudo não foi utilizada pressão interna positiva para simular as condições pulpares *in vivo*, e portanto os resultados não devem ser extrapolados para sistemas vivos. Contudo fica claro que agentes clareadores se difundem por



uma barreira dentinária de 0,5mm e podem potencialmente danificar células pulpare. Além disso, este é um trabalho pioneiro, onde células de linhagem odontoblástica cresceram em discos de dentina de 0,5mm de espessura e estes foram utilizados nos testes com os agentes clareadores, simulando as condições clínicas onde estes materiais são aplicados em áreas de exposição dentinária, como em erosões ou abfrações cervicais de dentes anteriores. Nestes dentes, a espessura dentinária é muito próxima de 0,5mm. Assim, como os odontoblastos estão aderidos ao outro lado desta parede dentinária (no interior da câmara pulpar), estas células seriam as primeiras células pulpare a entrar em contato com substâncias que se difundem pelos tecidos dentais. Desta maneira, torna-se importante avaliar os efeitos dos agentes clareadores sobre células de linhagem odontoblástica, mesmo que seja em estudos *in vitro*. Todavia, as diversas metodologias recomendadas para avaliar os efeitos citotóxicos e a biocompatibilidade de novos materiais e técnicas de aplicação, trazem, a cada momento, dados científicos importantes, os quais somados, caracterizam e direcionam a segurança de sua aplicação clínica.

## **Conclusão**

---

## 7 Conclusão

De acordo com a metodologia empregada e resultados obtidos, foi possível concluir que:

1. o peróxido de hidrogênio nas concentrações de 7,5%; 20% e 35% apresentou a capacidade de agir, através de barreira dentinária de 0,5mm de espessura, sobre células de linhagem odontoblástica MDPC-23, causando significativo efeito citotóxico;
2. os agentes clareadores à base de peróxido de hidrogênio nas três concentrações testadas: 7,5%; 20% e 35%, foram citotóxicos para as células odontoblásticas MDPC-23, promovendo inibição do metabolismo celular de 62,65%; 62,28% e 65,69%, respectivamente;
3. a permeabilidade dentinária não interferiu ou influenciou a difusão e efeitos citotóxicos do agente clareador experimental nas suas diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio avaliadas.

## Referências

---

## Referências\*

1. ABOU HASHIEH, I. et al. Relationship between dentine hydraulic conductance and cytotoxicity of four dentine bonding resins *in vitro*. **J. Dent.**, Guildford, v. 26, n. 5/6, p. 473-77, July/Aug. 1998.
2. AMES, J.W. Removing stains from mottled enamel. **J. Am. Dent. Assoc.**, Chicago, v. 24, n. 10, p. 1674-1677, Oct. 1937.
3. ANDERSON, D.G. et al. A clinical assessment of the effects of 10% carbamide peroxide gel on human pulp tissue. **J. Endod.**, Chicago, v.25, n. 4,p. 247-250, Apr. 1999.
4. AREN, G. In vitro effects of bleaching agents on FM3A cell line. **Quintessence Int.**, Berlin, v. 34, n. 5, p. 361-365, May 2003.

---

\*ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023:** informação e documentação – referências - elaboração.  
Rio de Janeiro, 2002. 24p.

5. ARWILL, T.; MYRBERG, N.; SOREMARK, R. Penetration of radioactive isotopes through enamel and dentin. II. Transfer of  $^{22}\text{Na}$  in fresh and chemically treated dental tissues. **Odontol. Revy**, Lund, v. 20, n. 1, p. 47-54, 1969.
6. BARKER, G.T. The causes and treatment of discolored teeth. **Dent. Cosmos**, Philadelphia, v. 3, n. 3, p. 305-11, May 1861.
7. BAUMGARTNER, J.C.; REID, D.E.; PICKETT, A.B.. Human pulpal reaction to the modified McInnes bleaching technique. **J. Endod.**, Chicago, v. 9, n. 12, p.527-529, Dec. 1983.
8. BENETTI, A.R. et al. In vitro penetration of bleaching agents into the pulp chamber. **Int. Endod. J.**, Oxford, v. 37, n. 2, p, 120-124, Feb. 2004.
9. BOWLES, A.R.; BURNS Jr., H. Catalase/peroxidase activity in dental pulp. **J. Endod.**, Chicago, v. 18, n. 11, p. 527-529, Nov. 1992.
10. BOWLES, W.H.; THOMPSON, H.R. Vital bleaching: the effects of heat and hydrogen peroxide on pulpal enzymes. **J. Endod.**, Chicago, v. 12, n. 3, p. 108-112, Mar. 1986.

11. BOWLES, W.H.; UGWENERI, Z. Pulp chamber penetration by hydrogem peroxide following vital bleaching procedures. **J. Endod.**, Chicago, v. 13, n. 8, p. 375-377, Aug. 1987.
12. COHEN, S.C.; CHASE, C. Human pulpal response to bleaching procedures on vital teeth. **J. Endod.**, Chicago, v. 5, n. 5, p. 134-138, May 1979.
13. COOPER, J.S.; SOKMEYER, T.T.; BOWLES, W.H. Penetration of the pulp chamber by carbamide peroxide bleaching agents. **J. Endod.**, Chicago, v. 18, n. 7, p. 315-317, July 1992.
14. COSTA, C.A.S.; HANKS, C.T. Capacity of L 929 and BALB/C 3T7 fibroblasts to survive on human dentin discs. **Braz. Endod. J.**, Goiânia, v. 3, n. 2, p. 7-13, 1998.
15. COSTA, C.A.S.; HANKS, C.T. Cultura de fibroblastos L 929 sobre discos de dentina humana, avaliação em microscopia de contraste de fase e eletrônica de varredura. **Rev. Odontol. UNESP**, São Paulo, v. 28, n. 2, p. 251-262, jul./dez. 1999.
16. COSTA, C.A.S.; EDWARDS, C.A.; HANKS, C.T. Cytotoxic effects of cleasing solutions recommended for chemical lavage of pulp exposures. **Am. J. Dent.**, San Antonio, v. 14, n. 1, p. 25-30, Feb. 2001.

17. COSTA, C.A.S.; MESAS, A.N.; HEBLING, J. Pulp response to direct capping with an adhesive system. **Am. J. Dent.**, San Antonio, v. 13, n. 2, p. 81-87, Apr. 2000.
18. COSTA, C.A.S. et al. Cytotoxic effects of current dental adhesive systems on immortalized odontoblast cell line MDPC-23. **Dent. Mater.**, Copenhagen, v. 15, n. 6, p. 434-441, Nov. 1999.
19. COSTA, C.A.S. et al. Biocompatibility of resin-based materials used as pulp-capping agents. **Int. Endod. J.**, Oxford, v. 36, n. 12, p. 831-839, Dec. 2003.
20. DWINELLE, W.W. Ninth Annual Meeting of American Society of Dental Surgeons. Article X. **Am. J. Dent. Sci.**, v. 1, p. 57-61, 1850 apud HAYWOOD, V.B. History, safety, and effectiveness of current bleaching techniques and applications of the nightguard vital bleaching technique. **Quintessence Int.**, Berlin, v. 23, n.7, p. 471- 488, July 1992.
21. FEINMAN, R.A; GOLDSTEIN, R.E.; GARBER, D.A. **Bleaching teeth.** Chicago: Quintessence Books, 1987, 102 p.
22. FISHER, G. The bleaching of discolored teeth with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> . **Dent. Cosmos**, Philadelphia, v. 53, n. 2, p. 246-7, Feb. 1911.



23. FITCH C.P. Etiology of discoloration of teeth. **Dent. Cosmos**, Philadelphia, v. 3, n. 1, p. 133- 136, Jan. 1861.
24. FLOYD, R.A. The effect of peroxides and free radicals on body tissues. **J. Am. Dent. Assoc.**, Chicago, v. 128, suppl., p. 37S – 40S, Apr. 1997.
25. GARBER, D.A. Dentist-monitored bleaching: a discussion of combination and laser bleaching. **J. Am. Dent. Assoc.**, Chicago, v. 128, n. 4, suppl., p. 26S – 30S, Apr. 1997.
26. GOKAY, O. et al. Penetration of the pulp chamber by bleaching agents in teeth restored with various restoratives materials. **J. Endod.**, Chicago, v. 26, n. 2, p. 92-94, Feb. 2000.
27. GOLDSTEIN, R.E. In office bleaching: where we came from, where we are today. **J. Am. Dent. Assoc.**, Chicago, v. 128, n. 4, suppl., p. 11S-15S, Apr. 1997.
28. GONZÁLEZ-OCHOA, J.G. Histological assessment of dental pulp after vital bleaching with 10% carbamide peroxide. 2002. 71p. Thesis (MSD) Indiana University School of Dentistry.

29. HANKS, C.T. et al. Characterization of the “*in vitro* pulp chamber” using the cytotoxicity of phenol. **J. Oral Pathol. Med.**, v. 18, n. 2, p. 97-107, Feb. 1989.
30. HANKS, C.T. et al. Cytotoxicity and dentin permeability of carbamide peroxide and hydrogen peroxide vital bleaching materials, *in vitro*. **J. Dent. Res.**, Chicago, v. 72, n. 5, p. 931-938, May 1993.
31. HANKS, C.T. et al. Cloned 3T6 cell line from CD-1 mouse fetal molar dental papillae. **Connective Tissue Res.**, London, v. 37, n. 3-4, p. 233-249, Mar./Apr. 1998.
32. HANKS, C.T. et al. Dentin-specific proteins in MDPC-23 cell line. **Eur. J. Oral Sci.**, London, v. 106, suppl. 1, p. 261-267, Jan. 1998.
33. HARLAN, A.W. Proceedings of Dental Societies. American Dental Association- Twenty-third Annual Session. **Dent. Cosmos**, Philadelphia, v. 26, n. 1, p. 97-8, Jan. 1884.
34. HAYWOOD, V.B. History, safety, and effectiveness of current bleaching techniques and applications of the nightguard vital bleaching technique. **Quintessence Int.**, Berlin, v. 23, n.7, p. 471- 88, July 1992.

35. HAYWOOD, V.B. Nightguard vital bleaching: current concepts and reserch.  
**J. Am. Dent. Assoc.**, Chicago, v. 128, suppl., p. 19S – 25S, Apr. 1997.
36. HAYWOOD, V.B.; HEYMANN, H.O. Nightguard vital bleaching.  
**Quintessence Int.**, Berlin, v. 20, n.3, p. 173-1764, Mar. 1989.
37. KANNO, S. et al. Effects of naringin on hydrogen peroxide-induced cytotoxicity and apoptosis in P388 cells. **J. Pharmacol. Sci.**, v. 92, n. 2, p. 166- 170, June 2003.
38. KAWAMOTO, K.; TSUJIMOTO, Y. Effect of the hydroxyl radical and hydrogen peroxide on tooth bleaching. **J. Endod.**, Chicago, v. 30, n. 1, p. 45-50, Jan. 2004.
39. KIRK, E.C. The chemical bleaching of teeth. **Dental Cosmos**, Philadelphia, v. 31, p. 273-83, 1889.
40. KOULAOUZIDOU, E. et al. In vitro evaluation of the cytotoxicity of a bleaching agent. **Endod. Dent. Traumatol.**, Copenhagen, v. 14, n. 1, p. 21-5, Feb. 1998.

41. LATIMER, J.S. Notes from the discussion of the Society of Dental Surgeons in the city of New York. **Dent. Cosmos**, Philadelphia, v. 10, n. 5, p. 257-8, May 1868.
42. LEWINSTEIN, I. et al. Effect of hydrogen peroxide and sodium perborate on the microhardness of human enamel and dentin. **J. Endod.**, Chicago, v. 20, n. 2, p. 61-63, Feb. 1994.
43. LI, Y. Biological properties of peroxide-containing tooth whiteners. **Food Chem. Toxicol.**, v. 34, n. 9, p. 887-904, Sept. 1996.
44. MARTINELLI, A.C.B.F. et al. Avaliação da eficácia de agentes anti-hiperestésicos: métodos clínicos e laboratoriais. **Rev. Fac. Odontol. Bauru**, Bauru, v. 9, n.2/4, p. 157-166, jul./dez. 2001.
45. MATTHEWS, G.; PASHLEY, D.H. Effects of pulpal pressure on inward diffusion across dentin in vitro. **J. Dent. Res.**, Chicago, v. 71, n. 1, sp. Iss., p. 124, Jan. 1992. Abstract n. 152.
46. MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Methods**, Amsterdam, v. 65, p. 55-63, June 1983.

47. OUTHWAITE, W.C.; LIVINGSTON, M.J.; PASHLEY, D.H. Effects of changes in surface area, thickness, temperature and post-extraction time on human dentin permeability. **Arch. Oral Biol.**, Oxford, v. 21, n. 10, p.599-603, Oct. 1976.
48. OUTHWAITE, W.C.; MCKENZIE, D.M. ; PASHLEY, D.H. A versatile split-chamber device for studying dentin permeability. **J. Dent. Res.**, Chicago, v. 53, n. 6, p. 1503, Nov./ Dec. 1974.
49. PASHLEY, D.H. Consideration of dentine permeability in cytotoxicity testing. **Int. Endod. J.**, Oxford, v.21, n. 2, p. 143-154, Mar. 1988.
50. PASHLEY, D.H. et al. Regional variability in permeability of human dentine. **Arch. Oral Biol.**, Oxford, v. 32, n. 7, p. 519-23, July 1987.
51. PASHLEY, D.H. et al. The use of oxalate to reduce dentin permeability under adhesive restorations. **Am. J. Dent.**, San Antonio, v. 14, n. 2, p. 89-94, Apr. 2001.
52. POCTONIK, I.; KOSEC, L. ; GASPERSIC, D. Effect of 10% Carbamide peroxide bleaching gel on enamel microhardness, microstructure, and mineral content. **J. Endod.**, Chicago, v. 26, n. 4, p. 203-206, Apr. 2000.

53. PRINZ, H. Recent improvements in tooth bleaching. **Dent. Cosmos**, Philadelphia, v.66, n. 5, p. 558-560, May 1924.
54. ROBERTSON, W.D.; MELFI, R.C. Pulp response to vital bleaching procedures. **J. Endod.**, Chicago, v. 6, n. 7, p. 645-649, July 1980
55. SCHULTE, J.R. et al. The effects of bleaching application time on the dental pulp. **J. Am. Dent. Assoc.**, Chicago, v.125, n. 10, p. 1330-1335, Oct. 1994.
56. SEALE, N.S.; McINTOSH, J.E. ; TAYLOR, A.N.. Pulpal reaction to bleaching of teeth in dogs. **J. Dent. Res.**, Chicago, v. 60, n. 5, p. 948-953, May 1981.
57. SEGHI, R.R.; DENRY, I. Effects of external bleaching on indentation and abrasion characteristics of human enamel in vitro. **J. Dent. Res.**, Chicago, v. 71, n. 6, p. 1340-1344, June 1992.
58. SMITH, C.C. The biocompatibility of dental materials. In: SMITH, D.C.; WILLIAMS, D.F. **Biocompatibility of dental materials**. Boca Raton: CRC Press, 1982. v.1, chap.1, p.1-37.

59. SUDA, H.; IKEDA, H. The circulation of the pulp. In: HARGREAVES, K.M.; GOODIS, H.E. **Seltzer and Bender's dental pulp**. Carol Stream: Quintessence Publishing, 2002. chap. 6, p. 123-150.
  
60. SULIEMAN, M. et al. The bleaching depth of a 35% hydrogen peroxide based in-office product: a study in vitro. **J. Dent.**, Guildford, Dec. 2004. *Article in Press*.
  
61. SUN, G. The role of lasers in cosmetic dentistry. **Dent. Clin. North Am.**, Philadelphia, v. 44, n. 4, p. 831-849, Oct. 1998.
  
62. SUN, Z.L. et al. Expression of dentin sialoprotein (DSP) and other molecular determinants by a new cell line from dental papillae, MDPC-23. **Connective Tissue Res.**, London, v. 37, n. 3-4, p. 251-261, Mar./Apr. 1998.
  
63. THITINANTHAPAN, W.; SATAMANONT, P.; VONGSAVAN, N. In vitro penetration of the pulp chamber by three brands of carbamide peroxide. **J. Esthet. Dent.**, Philadelphia, v. 11, n. 5, p. 259-264, May 1999.
  
64. TITLEY, K.; TORNECK, C.D.; SMITH, D.C. Effect of concentrated hydrogen peroxide solution on the surface morphology of cut human dentin. **Endod. Dent. Traumatol.**, Copenhagen, v. 4, n. 1, p. 32-6, Feb. 1988.

65. TONDER, K.J.; KVINNSLAND, I. Micropuncture measurements of interstitial fluid pressure in normal and inflamed dental pulps in cats. **J. Endod.**, Chicago, v. 9, n. 3, p. 105-109, Mar.1983.
66. WANG, J.D.; HUME, W.R. Diffusion of hydrogen ion and hydroxyl ion from various sources through dentine. **Int. Endod. J.**, Oxford, v. 21, n. 1, p. 17-26, Jan. 1988.
67. WATAHA, J.C. et al. Cytotoxicity of componentes of resins and other dental restorative materials. **J. Oral Rehabil.**, Oxford, v. 21, n. 4, p. 453-462, July 1994.
68. WOOLVERTON, C.J.; HAYWOOD, V.B.; HEYMANN, H.C. Toxicity of two carbamide peroxide products used on nightguard vital bleaching. **Am. J. Dent.**, San Antonio, v. 6, n. 6, p. 310-314, Dec. 1993.
69. ZOUAIN-FERREIRA, S.L. et al. Evaluation of the potential cytotoxicity of dental bleaching agents. **Journal of Nutritional and Environmental Medicine**, Abingdon, v. 12, p. 33-37, 2002.



## **Anexos**

---

## Anexos

Anexo 1- Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa, sob protocolo 37/04

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |                                                                                                                                                                                                                                    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | <p>UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"</p> <p>FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA</p> <p>Comitê de Ética em Pesquisa</p>  |
| <h2>Certificado</h2>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |                                                                                                                                                                                                                                    |
| <p><b>Certificamos</b> que o projeto de pesquisa intitulado "AVALIAÇÃO IN VITRO DO EFEITO CITOTÓXICO DO PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO SOBRE CÉLULAS DE LINHAGEM ODONTOBLÁSTICA (MDPC-23)", sob o protocolo nº 37/04, de responsabilidade do Pesquisador (a) <i>CLAUDIA HUCK</i>, está de acordo com a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde/MS, de 10/10/96, tendo sido aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa-FOAr, com validade de 01 (um) ano, quando será avaliado o relatório final da pesquisa.</p>     |                                                                                                                                                                                                                                    |
| <p><b>Certify</b> that the research project titled "IN VITRO AVALUATION OF THE CYTOTOXICITY OF <i>HIDROGEN PEROXIDE APPLIED TO AN ODONTOBLAST CELL LINE (MDPC-23)</i>", protocol number 37/04, under Dr <i>CLAUDIA HUCK</i> responsibility, is under the terms of Conselho Nacional de Saúde/MS resolution # 196/96, published on May 10, 1996. This research has been approved by Research Ethic Committee, FOAr-UNESP. Approval is granted for 01 (one) year when the final review of this study will occur.</p> |                                                                                                                                                                                                                                    |
| <p>Araraquara, 03 de agosto de 2004.</p> <p>Profª Drª <i>Milena Aparecida Onofre</i><br/>Coordenadora</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                                                                                                                                                                                                                                    |

## Anexo 2- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para maiores de 18 anos

## **Consentimento Livre e Esclarecido**

Eu, \_\_\_\_\_ portador do documento n. \_\_\_\_\_, Data de nascimento: \_\_\_\_\_ (nacionalidade) \_\_\_\_\_, residente à \_\_\_\_\_, na cidade de \_\_\_\_\_, estado de \_\_\_\_\_, prontuário nº \_\_\_\_\_, entendo que estou autorizando minha participação, como voluntário, na pesquisa intitulada **AVALIAÇÃO "IN VITRO" DO EFEITO CITOTÓXICO DO PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO SOBRE CÉLULAS DE LINHAGEM ODONTOBLÁSTICA (MDPC-23)**, tendo como pesquisadores responsáveis a Dra. Cláudia Huck, o Dr. Edson Alves de Campos e o Dr. Carlos Alberto de Souza Costa.

Para tanto, tomo ciência de que:

01. serão utilizados nesta pesquisa os dentes que, segundo solicitação do ortodontista, deverão ser extraídos para que o tratamento ortodôntico possa ser realizado. A decisão de qual(is) dente(s) serão extraídos é de total responsabilidade do ortodontista, ficando os pesquisadores responsáveis pela execução desta pesquisa, alheios a esta decisão;
02. para a realização da exodontia, uma radiografia de diagnóstico será obtida imediatamente antes do dente ser cirurgicamente removido;
03. fui esclarecido que a referida pesquisa tem por objetivo avaliar a citotoxicidade do peróxido de hidrogênio para as células da polpa dental, (popularmente conhecido como "nervo" do dente, avaliando os efeitos que esta droga promove nessas células. Fui informado que este é um material odontológico usado em clareamento dental pela técnica realizada em consultório odontológico. Para tanto, será realizado um teste em laboratório, de modo que não terei participação direta na pesquisa, mas apenas os meus dentes extraídos serão utilizados. A pesquisa a ser realizada não trará benefícios imediatos para o paciente. Todavia, o resultado da pesquisa poderá contribuir com outros pacientes que serão submetidos ao tratamento clareador com peróxido de hidrogênio 38%, tais como o utilizado nesta pesquisa;

Protocolo CEP nº 37/04  
 aprovado em Reunião de  
15/06/04  
 \_\_\_\_\_  
 Coordenador do CEP-FO/CAZ.

04. tenho total autonomia para não consentir com a doação dos meus dentes para esta pesquisa, sem nenhuma repercussão ao atendimento nesta Faculdade ou Clínica;
05. o pesquisador responsável garante sigilo quanto aos dados confidenciais envolvidos na pesquisa,. Portanto, a minha identidade será preservada;
06. posso solicitar esclarecimentos antes e durante o desenvolvimento clínico, sobre os procedimentos a serem executados e tipo de material a ser utilizado.

Confirmando que recebi de maneira clara todas as informações relacionadas a pesquisa em questão. Assim, após ter compreendido todos os riscos que por ventura possam ocorrer, os meus direitos e deveres para com a pesquisa, informo que dou, por livre e espontânea vontade, os dentes \_\_\_\_\_, o(s) qual(is) foi(ram) recomendado(s) para extração pelo Dr(a) \_\_\_\_\_, para realização de tratamento ortodôntico.

Desta maneira, autorizo a Dra. Cláudia Huck, ao Dr. Edson Alves de Campos e ao Dr. Carlos Alberto de Souza Costa a utilizarem o(s) meu(s) dente(s) acima especificado(s) na pesquisa proposta.

Araraquara, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2004.

Paciente: \_\_\_\_\_ Assinatura \_\_\_\_\_

Protocolo CEP N° 37/04  
Aprovado em Reunião de  
15/06/04  
Secretaria do CEP-FO/CAa

\_\_\_\_\_  
Pesquisador: \_\_\_\_\_ Assinatura \_\_\_\_\_  
Colaborador

Pesquisador: \_\_\_\_\_ Assinatura \_\_\_\_\_  
Responsável

Pesquisador Orientador \_\_\_\_\_ Assinatura \_\_\_\_\_

Telefones: Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) (0xx16) 201-6432 / 201-6434  
Pesquisadores Responsáveis: (0xx19) 3827 2465 ou 201-6477

Protocolo CEP nº 37/04  
Aprovado em Reunião de  
15/06/04  
\_\_\_\_\_  
Secretaria de CEP-FO/CAp.

## Anexo 3 – Termo de consentimento Livre e Esclarecido para menores de 18 anos

## Consentimento Livre e Esclarecido

Eu, \_\_\_\_\_, portador do documento  
 N. \_\_\_\_\_, idade \_\_\_\_\_, RG \_\_\_\_\_,  
 endereço \_\_\_\_\_, responsável legal pelo paciente  
 \_\_\_\_\_, grau de parentesco  
 \_\_\_\_\_ e prova documental comprobatória da  
 responsabilidade pelo documento \_\_\_\_\_, entendo que estou autorizando  
 a participação do meu filho(a) \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_  
 anos, como voluntário na pesquisa intitulada **AVALIAÇÃO "IN VITRO" DO EFEITO  
 CITOTÓXICO DO PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO SOBRE CÉLULAS DE LINHAGEM  
 ODONTOBLASTICA (MDPC-23)**, tendo como pesquisadores responsáveis a Dra. Cláudia  
 Huck, o Dr. Edson Alves de Campos o Dr. Carlos Alberto de Souza Costa. Informo ainda, que  
 meu filho(a) foi consultado e concorda com sua participação voluntária.

Para tanto, tomamos ciência de que:

01. serão utilizados nesta pesquisa os dentes que, segundo solicitação do ortodontista, deverão ser extraídos para que o tratamento ortodôntico possa ser realizado. A decisão de qual(is) dente(s) serão extraídos é de total responsabilidade do ortodontista, ficando os pesquisadores responsáveis pela execução desta pesquisa, alheios a esta decisão;
02. para a realização da exodontia, uma radiografia de diagnóstico será obtida imediatamente antes do dente ser cirurgicamente removido;
03. a pesquisa tem o objetivo de testar um material quanto a sua atuação sobre células do tecido pulpar (popularmente conhecido como "nervo" do dente). Para tanto, será realizado um teste em laboratório, de modo que o meu filho não participará diretamente da pesquisa, mas apenas os seus dentes extraídos serão utilizados. A pesquisa a ser realizada não trará benefícios imediatos para o paciente. Todavia, o resultado da pesquisa poderá contribuir com outros pacientes que serão submetidos ao tratamento clareador com peróxido de hidrogênio 38% conforme o material experimental utilizado nesta pesquisa;

Protocolo CEP Nº 32/04  
 Aprovado em Reunião de  
15/06/04  
 \_\_\_\_\_  
 Secretária do CEP-FO/CAE.

04. como responsável pelo meu filho(a) tenho total autonomia para não consentir com a doação dos dentes de meu filho para esta pesquisa, assim como meu próprio filho(a) tem esta mesma liberdade se assim desejar, sem nenhuma repercussão ao atendimento nesta Faculdade ou Clínica;
05. o pesquisador responsável garante sigilo quanto aos dados confidenciais envolvidos na pesquisa, onde a identidade do meu filho(a) será preservada;
06. podemos solicitar esclarecimentos antes e durante o desenvolvimento clínico, sobre os procedimentos a serem executados e tipo de material utilizado.

Confirmamos que recebemos, eu e meu filho(a), de maneira clara todas as informações relacionadas a pesquisa em questão. Assim, após ter compreendido todos os riscos que por ventura possam ocorrer, os nossos direitos e deveres para com a pesquisa, informo que doaremos, por livre e espontânea vontade, os dentes \_\_\_\_\_, o(s) qual(is) foi(ram) recomendado(s) para extração pelo Dr(a) \_\_\_\_\_, para realização de tratamento ortodôntico.

Desta maneira, autorizamos a Dra. Cláudia Huck, ao Dr. Edson Alves de Campos e o Dr. Carlos Alberto de Souza Costa a utilizarem os dente(s) acima identificado(s) na pesquisa proposta.

Araraquara, \_\_\_\_ de \_\_\_\_ de 2004.

Responsável: \_\_\_\_\_ Assinatura \_\_\_\_\_

Paciente: \_\_\_\_\_ Assinatura \_\_\_\_\_



Pesquisador: \_\_\_\_\_ Assinatura \_\_\_\_\_  
Colaborador

Pesquisador: \_\_\_\_\_ Assinatura \_\_\_\_\_  
Responsável

Pesquisador Orientador \_\_\_\_\_ Assinatura \_\_\_\_\_

Telefones: Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) (0xx16) 201-6432 / 201-6434  
Pesquisadores Responsáveis: (0xx19) 3827 2465 ou 201-6477

Protocolo CEP Nº 37/04  
Aprovado em Reunião de  
15/06/04  
\_\_\_\_\_  
Secretário de CEP - FO/CAr.



Anexo 4 – Tabela dos dados coletados no teste de MTT, FOAr 2005

| Disco n°  | Blanc  | Grupo 1<br>H <sub>2</sub> O <sub>2</sub><br>7,5% | Grupo 2<br>H <sub>2</sub> O <sub>2</sub><br>20% | Grupo 3<br>H <sub>2</sub> O <sub>2</sub><br>35%% | Grupo 4<br>H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 0%<br>Gel sem<br>H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | Grupo 5<br>Controle<br>(Nenhum<br>tratamento) |
|-----------|--------|--------------------------------------------------|-------------------------------------------------|--------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------|
| 1         | 0,0385 | 0,0482                                           | 0,0501                                          | 0,0481                                           | 0,1047                                                                                  | 0,1104                                        |
| 1         | 0,0374 | 0,0491                                           | 0,0461                                          | 0,0463                                           | 0,1342                                                                                  | 0,1101                                        |
| 2         | 0,0377 | 0,0464                                           | 0,0495                                          | 0,0439                                           | 0,1299                                                                                  | 0,1164                                        |
| 2         | 0,0373 | 0,0458                                           | 0,0491                                          | 0,0442                                           | 0,1310                                                                                  | 0,1143                                        |
| 3         | 0,0406 | 0,0556                                           | 0,0466                                          | 0,0449                                           | 0,0770                                                                                  | 0,1728                                        |
| 3         | 0,0393 | 0,0533                                           | 0,0477                                          | 0,0483                                           | 0,0745                                                                                  | 0,1807                                        |
| 4         | 0,0376 | 0,0516                                           | 0,0521                                          | 0,0469                                           | 0,1081                                                                                  | 0,1207                                        |
| 4         | 0,0378 | 0,0515                                           | 0,0531                                          | 0,0476                                           | 0,1138                                                                                  | 0,1234                                        |
| 5         | 0,0385 | 0,0518                                           | 0,0515                                          | 0,0434                                           | 0,1197                                                                                  | 0,1297                                        |
| 5         | 0,0390 | 0,0510                                           | 0,0529                                          | 0,0431                                           | 0,1281                                                                                  | 0,1359                                        |
| 6         | 0,0416 | 0,0514                                           | 0,0565                                          | 0,0514                                           | 0,1115                                                                                  | 0,1509                                        |
| 6         | 0,0376 | 0,0505                                           | 0,0570                                          | 0,0498                                           | 0,1138                                                                                  | 0,1576                                        |
| Somatória | 0,4629 | 0,6062                                           | 0,6122                                          | 0,5579                                           | 1,3463                                                                                  | 1,6229                                        |
| Média     | 0,0385 | 0,0505                                           | 0,0510                                          | 0,0464                                           | 0,1121                                                                                  | 0,1352                                        |

## **Resumo**

---

HUCK,C. Efeito citotóxico transdentário do peróxido de hidrogênio em diferentes concentrações sobre células de linhagem odontoblásticas MDPC-23. 2005. 167f. Dissertação (Mestrado em Dentística Restauradora) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2005.

## **Resumo**

O objetivo da presente pesquisa foi avaliar *in vitro* os efeitos citotóxicos de diferentes concentrações de um agente clareador de ativação dual à base de peróxido de hidrogênio, sobre células de linhagem odontoblástica MDPC-23. Para isso, 50 discos de dentina com 0,5mm de espessura, obtidos de dentes terceiros molares humanos íntegros, foram tratados com EDTA 0,5 M, pH 7,4 por 1 minuto, sendo a condutância hidráulica ( $L_p$ ;  $\mu\text{L}/\text{mm}^2/\text{min}/\text{cm H}_2\text{O}$ ) determinada para cada um deles. Estes discos foram distribuídos em 5 grupos de acordo com os valores de permeabilidade. Os discos de dentina adaptados a um dispositivo metálico foram autoclavados, posicionados de maneira invertida (superfície pulpar dos discos voltados para cima) em recipientes plásticos de 24 compartimentos (“wells”). Então,  $5 \times 10^4$  células MDPC-23/ $\text{cm}^2$  foram semeadas em cada compartimento. Após 72 horas de incubação na temperatura de 37° C, 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de ar, os dispositivos com os discos foram invertidos nos compartimentos, de tal maneira que os materiais experimentais pudessem ser aplicados (2 trocas de 15 minutos cada) sobre a superfície oclusal dos discos, caracterizando os

seguintes grupos experimentais: G1: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 7,5%; G2: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 20%; G3: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 35%; e G4: gel base (sem o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). No grupo controle (G5) os discos não foram tratados. Após esta etapa do experimento, o metabolismo das células MDPC-23 que permaneceram aderidas à superfície pulpar dos discos de dentina foi avaliado pela técnica de MTT. A morfologia das células e dentina tratada com os agentes experimentais foram avaliadas em microscopia eletrônica de varredura. A análise estatística de Kruskal-Wallis demonstrou que as três concentrações do agente clareador à base de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> causaram intenso efeito citotóxico sobre as células MDPC-23. As concentrações de 7,5%, 20% e 35% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aplicadas sobre os discos de dentina com 0,5mm de espessura reduziram o metabolismo celular em 62,65%, 62,28% e 65,69%, respectivamente. O teste estatístico complementar de Mann-Whitney determinou que não havia diferença entre os grupo 1 e 2. O gel clareador sem o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> incorporado causou redução de 17,09% no metabolismo das células. O teste não paramétrico de correlação demonstrou que os efeitos citotóxicos do agente clareador com diferentes concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> não foram influenciados pela permeabilidade dos discos de dentina. Foi possível concluir, de acordo com as condições experimentais que, independente da permeabilidade dos discos de dentina e da concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> incorporada no gel clareador, este apresenta intenso efeito citotóxico sobre células de linhagem odontoblástica MDPC-23.

**Palavras-chave:** Peróxido de hidrogênio, Odontoblastos, Teste de materiais, Permeabilidade da dentina.

## **Abstract**

---

HUCK,C. Transdental cytotoxic effects of different concentrations of hydrogen peroxide on the odontoblast-cell line MDPC-23. 2005. 167f. Dissertação (Mestrado em Dentística Restauradora) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2005.

## **Abstract**

The aim of this *in vitro* study was evaluate the transdental effects of an experimental bleaching agent with different concentration of hydrogen peroxide on the immortalized odontoblast-cell line MDPC-23. Fifty dentin disks, 0.5mm thick, cut from extracted non-carious permanent third human molar were conditioned for 1 minute with 0.5M EDTA, pH 7.4 and the hydraulic conductance ( $L_p$ ;  $\mu\text{L}/\text{mm}^2/\text{min}/\text{cm H}_2\text{O}$ ) was determined. The dentin discs were adapted to a metallic device which were sterilized and placed in wells of 24-well dishes (the pulpal surface of the discs remained in up position). Then, the cells were plated ( $5 \times 10^4$  cells/ $\text{cm}^2$ ) on the pulpal surface of the discs and incubated for 72 hours at  $37^\circ\text{C}$ , with 5%  $\text{CO}_2$  and 95% air. The metallic devices with the adapted dentin discs were inverted into the wells in such way that the experimental bleaching agents were applied on the occlusal surface of the discs for 30 minutes (2 changes of 15 minutes). The different concentration of  $\text{H}_2\text{O}_2$  present in the bleaching agent gave rise to the following experimental groups: G1: 7.5%  $\text{H}_2\text{O}_2$ ; G2: 20%  $\text{H}_2\text{O}_2$ ; G3: 35%  $\text{H}_2\text{O}_2$ ; and G4: 0%  $\text{H}_2\text{O}_2$ . In control group the dentin discs were not

submitted to treatment. The metabolism of MDPC-23 cells which remained attached to the pulpal surface of the discs was evaluated by the methyltetrazolium assay (MTT) and the cell and dentin morphology was assessed under scanning electron microscope (SEM). The statistical analysis of Kruskal-Wallis determined that the experimental bleaching agent caused an intense cytotoxic effects on the MDPC-23 cells. This experimental agent containing H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> at 7.5%; 20%; and 35% concentration decreased the cell metabolism by 62.65%; 62.28%; and 65.69%, respectively. The complementary statistical test of Mann-Whitney demonstrated no difference between groups 1 and 2. The bleaching agent with no H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in its formulation reduced the cell metabolism by 17.09%. The correlation test determined that the cytotoxic effects of the experimental bleaching agents were not influenced by the permeability of the dentin discs. It was concluded that independent on the permeability of the dentin discs used in the present *in vitro* study, all concentrations of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> incorporated in the bleaching gel caused transdential cytotoxic effects on the MDPC-23 cultured cells.

**Keywords:** Hydrogen peroxide, Odontoblasts, Material testing, Dentin permeability.