

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARAÇATUBA**

Francine Benetti

**Influência do número de sessões de
clareação sobre a polpa dentária de
ratos Wistar**

Araçatuba - São Paulo

2013

Francine Benetti

**Influência do número de sessões de clareação sobre
a polpa dentária de ratos Wistar**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentada à Faculdade de Odontologia
de Araçatuba, da Universidade Estadual
Paulista “Julio de Mesquita Filho” - UNESP,
como parte dos requisitos para obtenção
do título de Cirurgião Dentista.

Orientador: Prof. Dr. Luciano Tavares Ângelo Cintra

Araçatuba - São Paulo

2013

Benetti, F. Influência do número de sessões de clareação sobre a polpa dentária de ratos Wistar. Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2013.

Resumo

O objetivo deste estudo foi verificar a influência do número de sessões de clareação sobre a polpa dentária de ratos Wistar. Foram utilizados 50 ratos divididos em 5 grupos experimentais de 10 animais cada: I- 1 sessão de clareação; II- 2 sessões de clareação; III- 3 sessões de clareação; IV- 4 sessões de clareação; V- 5 sessões de clareação. Em todas as sessões os animais foram anestesiados e foi realizada a clareação dentária nos 3 molares superiores direito. Na primeira semana o grupo V recebeu o gel clareador enquanto os demais grupos receberam o gel placebo. Na segunda semana os grupos IV e V receberam o gel clareador enquanto os outros grupos o gel placebo. Na terceira semana os grupos III a V receberam o gel clareador e os demais grupos o gel placebo. Na quarta semana os grupos II a V receberam o gel clareador enquanto o grupo I recebeu o gel placebo. Por fim, na última semana de clareação, todos os grupos receberam o gel clareador. Após 2 dias todos os animais foram sacrificados e as maxilas removidas, processadas laboratorialmente e avaliadas sob microscopia óptica. Cada grupo experimental foi comparado com os molares superiores esquerdos correspondentes. Os cortes teciduais corados em H.E. foram analisados qualitativamente em cada região de interesse, mostrando alterações significativas na polpa dentária em todos os grupos tratados com o agente clareador ($p < 0.5$). No grupo I foi observado tecido pulpar necrosado na região de cornos pulpares e presença de infiltrado inflamatório subjacente. Tais alterações foram em maior extensão e intensidade à medida que se aumentou o número de sessões de clareação. No grupo V pode-se observar áreas necróticas no tecido pulpar até o segundo terço da polpa radicular, que apresentou infiltrado inflamatório intenso no terço apical. Pode-se concluir que o número de sessões de clareação em dentes de ratos Wistar influencia nos danos causados à polpa dentária, tornando-os mais elevados, de acordo com número de sessões de clareação.

Palavras-chave: Clareação dentária. Resposta pulpar. Peróxido de hidrogênio.

Benetti, F. Influence of the number of sessions dental bleaching on the pulp of Wistar rats. Araçatuba. UNESP - São Paulo State University, 2013.

Abstract

The aim of this study is to assess the influence of the number of dental bleaching sessions on coronal pulp of Wistar rats. Will be used 50 rats divided into 5 groups of 10 animals each. GI - 1 bleaching session, GII - 2 bleaching sessions; GIII - 3 bleaching sessions, GIV - 4 bleaching sessions, GV - 5 bleaching sessions. In all sessions the animals will be anesthetized and will be held in the third molar tooth bleaching upper right. In the first week, the five group will receive the whitening gel while the other groups receive a placebo gel. In the second week the groups IV and V will receive the whitening gel while the other group a placebo gel. In the third week, the groups III to V will receive the whitening gel and the other group a placebo gel. In the fourth week, the groups II to V will receive the whitening gel and the group I will receive a placebo gel. The last week of bleaching all groups receive the whitening gel. After more two days all the animals are sacrificed and the jaws removed and processed for evaluation in light microscopy. The tissue sections are stained with HE and evaluated by pre-established criteria by assigning scores to microscopic events. The results will be statistically analyzed by Kruskal Wallis and Dunn with a significance level of 5% ($p < 0.05$).

Keywords: Tooth bleaching. Reaction pulp. Hydrogen peroxide.

Sumário

1.Introdução	22
2.Proposição	25
3.Material e Método	26
4.Resultado	32
5.Discussão	38
6.Conclusão	43
Referências	44
Agradecimento	50

1. Introdução

A estética permite caracterizar algo como belo, agradável ou até grandioso. Atualmente, muitas pessoas buscam atingir padrões estéticos aceitos pela sociedade, inclusive no que se refere à estética dentária, que determina que os dentes devem ser brancos, simétricos e bem alinhados na arcada. Em certos casos, o planejamento odontológico acaba priorizando a estética em detrimento da função ou mesmo das consequências biológicas que determinados procedimentos possam acarretar.

A clareação dentária se insere como um dos principais recursos que o profissional dispõe para oferecer aos pacientes um sorriso com dentes “brancos”, satisfazendo os padrões de beleza valorizados pela sociedade^{1,2}. Um dos maiores avanços na clareação dentária foi conseguido em 1968, quando um ortodontista americano chamado Bill Klusmier observou que o emprego do peróxido de carbamida no tratamento da gengivite provocava como efeito colateral a clareação dentária³.

Já em 1989, Haywood & Heymann descreveram a técnica da clareação caseira⁴ e, a partir de então, uma série de métodos e posologias foram descritas para a clareação de dentes vitais. No entanto, a técnica caseira, com o peróxido de carbamida (PC) a 10%, continua sendo a forma mais aceita e documentada na literatura, sendo considerada segura e eficaz^{5,6}, e por esta razão apontada como o padrão ouro para a comparação com outras terapias clareadoras⁷.

O PC em contato com os tecidos dentais se dissocia em uréia e peróxido de hidrogênio (PH). Acredita-se que o processo clareador ocorra, pelo menos em parte, devido ao baixo peso molecular do PH, que se difunde facilmente pelo esmalte e dentina, liberando espécies reativas de oxigênio, que por serem instáveis, buscam a reação com outras substâncias livres ou fracamente ligadas e conseguem novamente a estabilidade molecular^{8,9}. Esse fenômeno oxidante possivelmente explica o mecanismo complexo da clareação dentária¹⁰.

Com o objetivo de acelerar e aumentar a eficácia clareadora, novas posologias têm sido propostas. O emprego de baixas concentrações de PH (3-12%), para uso caseiro tem sido indicado para reduzir o tempo diário de uso da moldeira e conseqüentemente causar menor desconforto para o paciente. Da mesma forma, produtos mais concentrados, como os à base PH a 35%, objetivam atender aos pacientes que não toleram o uso da moldeira ou anseiam resultados rápidos.

No entanto, sabe-se que quanto maior a concentração e o tempo de exposição do tecido dentário ao produto clareador, maior é a liberação de espécies reativas de oxigênio, e os seus efeitos em tecidos duros e na polpa têm sido cada vez mais questionados^{7,9,11,12}. Acredita-se que os possíveis danos sejam causados por componentes tóxicos liberados pelo produto clareador, que se difundem através do esmalte e dentina, atingindo o tecido pulpar^{13,14}. É relatado ainda que o PH e os produtos derivados de sua degradação, como os íons hidroxila (OH⁻), podem causar estresse oxidativo e efeitos citopatológicos como mutação, inativação enzimática, fragmentação, degradação proteica e por fim, apoptose celular¹⁴⁻¹⁷.

Tem sido demonstrado que além do tempo de exposição e da concentração do clareador que permanece sobre o esmalte^{8,9,18,19}, a “ativação” com calor²⁰, a espessura da estrutura dental de cada grupo de dentes^{12,21}, bem como o número de sessões clareadoras também podem influenciar na penetração de radicais livres derivados do oxigênio na câmara pulpar^{20,22} e que esta ocorrência poderia estar associada à inflamação da polpa e à sensibilidade dentária²³.

Do ponto de vista histológico algumas referências são estabelecidas para se determinar se um tecido contém alterações suficientes e representativas de um processo inflamatório. O processo de manifestação da dor nestes casos está diretamente vinculado ao estado inflamatório observado no tecido pulpar. Já foi observado que a polpa humana após a clareação caseira com peróxido de carbamida a 10% apresenta discretas alterações inflamatórias reversíveis após 14 dias do término do tratamento²⁴. Em dentes de cães, o peróxido de hidrogênio isolado ou associado ao calor ocasiona alterações na camada de odontoblastos e aumento na deposição de dentina. Também foi demonstrado que a presença de hemorragia e inflamação está relacionada com o período de 3 a 15 dias após a clareação, sendo revertida 60 dias após o tratamento²⁵.

Porém, a literatura ainda não contempla a influência que repetidos procedimentos de clareação exercem sobre o tecido pulpar, mesmo considerando que são cada vez mais frequentes os anseios estéticos dos pacientes por dentes cada vez mais brancos. Dentre os diferentes modelos experimentais usados para se verificar as alterações pulpares²⁵⁻²⁸, os estudos in vivo realizados em ratos são uma alternativa de fácil padronização e reprodução, possibilitando o isolamento de fatores influentes.

Desta forma, procuramos desenvolver um estudo a fim de investigar por meio da análise do tecido pulpar, a influência do número de sessões de clareação dentária sobre a polpa dentária de ratos Wistar.

2. Proposição

O objetivo deste trabalho de pesquisa foi investigar por meio da análise do tecido pulpar a influência do número de sessões de clareação dentária sobre a polpa dentária de ratos Wistar, identificando alterações morfológicas e estruturais do tecido pulpar, bem como o seu estado de homeostasia.

3. Material e Métodos

Material

1 - Animais

Foram utilizados 50 ratos machos (*Rattus albinus*, Wistar), pesando aproximadamente 200g, provenientes do biotério da Universidade Estadual Paulista (UNESP) – Faculdade de Odontologia de Araçatuba. Os animais foram mantidos em ambiente com temperatura entre 22 e 24°C com ciclo de luz controlada (12 horas claro e 12 horas escuro) e em gaiolas coletivas, cinco ratos por gaiola, alimentados durante todo o período experimental com dieta sólida e água “ad libitum”, exceto nas primeiras 24 horas após a intervenção. Os procedimentos experimentais foram submetidos ao Comitê de Ética do local (CEUA 00824-2012).

2 - Drogas empregadas

Para anestesia dos animais foram utilizados via intramuscular um sedativo à base de xilazina (Dopaser, Calier S.A. - Barcelona, Espanha – 10mg/Kg) e um anestésico à base de Cloridrato de Ketamina a 5% (Vetanarcol, König S. A. – Avellaneda, Argentina – 25mg/Kg).

3 - Agentes Clareadores

Nas sessões de clareação dentária foi empregado o agente clareador Whiteness HP Maxx (FGM Produtos Odontológicos) à base de PH a 35%. Este produto apresenta-se comercialmente em dois frascos, um contendo o peróxido e o outro, o agente espessante, sendo estas substâncias misturadas na proporção de 3:1. O gel placebo foi constituído de água destilada misturada com o mesmo espessante empregado no grupo experimental.

Métodos

1 - Divisão em grupos:

Os 50 ratos foram divididos aleatoriamente em 5 grupos experimentais (n=10), de acordo com o número de sessões de clareação dentária e podem ser visualizados na tabela 1.

Tabela 1 – Distribuição dos grupos experimentais de acordo com o número de sessões de clareação dentária

GRUPOS	Tratamento realizado	n
I	1 sessão clareadora e 4 sessões placebo	10
II	2 sessões clareadoras e 3 sessões placebo	10
III	3 sessões clareadoras e 2 sessões placebo	10
IV	4 sessões clareadoras e 1 sessão placebo	10
V	5 sessões clareadoras	10

Primeira Semana:

Todos os animais foram anestesiados via intramuscular associando o sedativo Dopaser, à base de xilazina (relaxante muscular, analgésico e sedativo), na dosagem de 10mg por Kilograma de peso corporal com o anestésico Vetanarcol, à base de cloridrato de Ketamina a 5% na dosagem de 25mg por Kilograma de peso corporal.

Após anestesia, foi realizada a aplicação e fotoativação da barreira gengival resinosa (Top Dam – FGM Produtos Odontológicos) e, em seguida, foi aplicado 0,01 ml do produto sobre cada um dos 3 molares superiores direito dos animais do grupo V, permanecendo em contato com o esmalte por 15 minutos. Posteriormente, a superfície foi limpa com algodão e papel absorvente e o produto foi reaplicado por mais 2 vezes, totalizando 45 minutos de exposição. Os animais dos grupos I, II, III e IV receberam apenas o gel placebo de forma semelhante ao agente clareador. Os molares superiores esquerdos serviram de controle, não recebendo qualquer tratamento.

Em todas as sessões seguintes foi empregado o mesmo protocolo para clareação e agente placebo.

Segunda Semana:

Após uma semana os animais foram novamente anestesiados com o mesmo protocolo empregado na primeira sessão. Os grupos IV e V receberam o agente clareador, enquanto os grupos I, II e III receberam apenas o gel placebo.

Terceira Semana:

Na terceira semana, os animais foram anestesiados, e os dos grupos III, IV e V receberam o agente clareador, enquanto os dos grupos I e II receberam apenas o gel placebo.

Quarta Semana:

Na quarta semana, os animais foram anestesiados e os grupos II, III, IV e V receberam o agente clareador, enquanto que os animais do grupo I receberam apenas o gel placebo.

Quinta Semana:

Na última semana, uma vez anestesiados, os animais de todos os grupos receberam o agente clareador. Este delineamento fez com que todos os animais fossem expostos aos mesmos níveis de estresse, possibilitando concluir que as eventuais diferenças observadas na resposta pulpar estariam relacionadas com o número de sessões de aplicação do agente clareador.

Sacrifício e processamento laboratorial:

Decorrido o período pré-determinado de 48 horas após a quinta semana, os animais foram sacrificados com uma super dose de cloridrato de ketamina (anestésico) que foi injetada no coração²⁹.

Após a morte, foi removida toda a pele correspondente à face direita do animal e com dois cortes realizados com tesoura no ângulo da boca, foi realizada a separação da mandíbula e maxila. Na sequência, empregando uma lâmina

intercambiável nº15, montada em cabo de bisturi, foi realizada uma incisão em profundidade no palato do animal, ao nível do plano sagital mediano acompanhando a sutura intermaxilar, separando a hemimaxila direita da esquerda. Separadas as maxilas, foi realizado um outro corte de modo a tangenciar a face distal dos molares superiores direito, possibilitando a obtenção da hemimaxila direita e esquerda, contendo os dentes posteriores, objeto do estudo.

As hemimaxilas foram colocadas imediatamente em frascos individuais devidamente identificados, contendo solução tamponada de formalina a 10%, pH neutro. As peças permaneceram nesta solução durante as primeiras 48 horas e depois foram lavadas em água corrente por 5 horas, objetivando a remoção de toda solução de fixação. Após a fixação, as peças foram desmineralizadas em solução de EDTA a 18%, por aproximadamente 30 dias. Posteriormente, as hemimaxilas foram lavadas em água corrente, desidratadas em álcool, diafanizadas em xilol e incluídas em parafina. A orientação no momento da inclusão permitiu a realização de cortes teciduais dos molares superiores e estruturas de suporte em seu sentido longitudinal.

Posteriormente, as peças foram seccionadas de forma semi-seriada, com 6 µm de espessura, em micrótomo de tecido mole (Leica - RM 2045). Para cada espécime, 10 lâminas com 3 cortes teciduais foram preparadas e coradas com Hematoxilina e Eosina³⁰.

Na sequência foi realizada a análise microscópica em microscópio óptico (DM 4000 B, Leica®, Germany), em aumentos de 50x, 100x e 400x.

Os achados histológicos foram expostos por meio de duas análises, sendo uma descritiva e outra quantitativa, de acordo com o grupo experimental. Os molares superiores murinos direitos e esquerdos (com e sem tratamento clareador) foram avaliados para diagnosticar o estado pulpar quanto aos sinais ou critérios morfológicos que denotem inflamação pulpar, envelhecimento precoce ou necrose. As lâminas contendo os cortes mais representativos de cada espécime foram avaliadas sob a microscopia óptica.

- ANÁLISE DESCRITIVA

A análise microscópica descritiva da reação do tecido pulpar frente ao processo de clareação dentária consistiu na descrição dos fenômenos histopatológicos, procurando caracterizá-los globalmente em função das variáveis experimentais.

- ANÁLISE QUANTITATIVA

A análise quantitativa consistiu da avaliação do infiltrado inflamatório, atribuindo magnitudes registradas sob a forma de escores de 1 a 4, gerando dados para análise estatística por meio do Software Pacote (Microsoft Visual FoxPro, Direitos: Eymar Sampaio Lopes).

O processo inflamatório foi analisado considerando sua intensidade e distribuição no tecido pulpar, em conformidade com o número médio aproximado de células inflamatórias presentes nos diferentes terços, de um mesmo espécime, examinados em aumento de 400X.

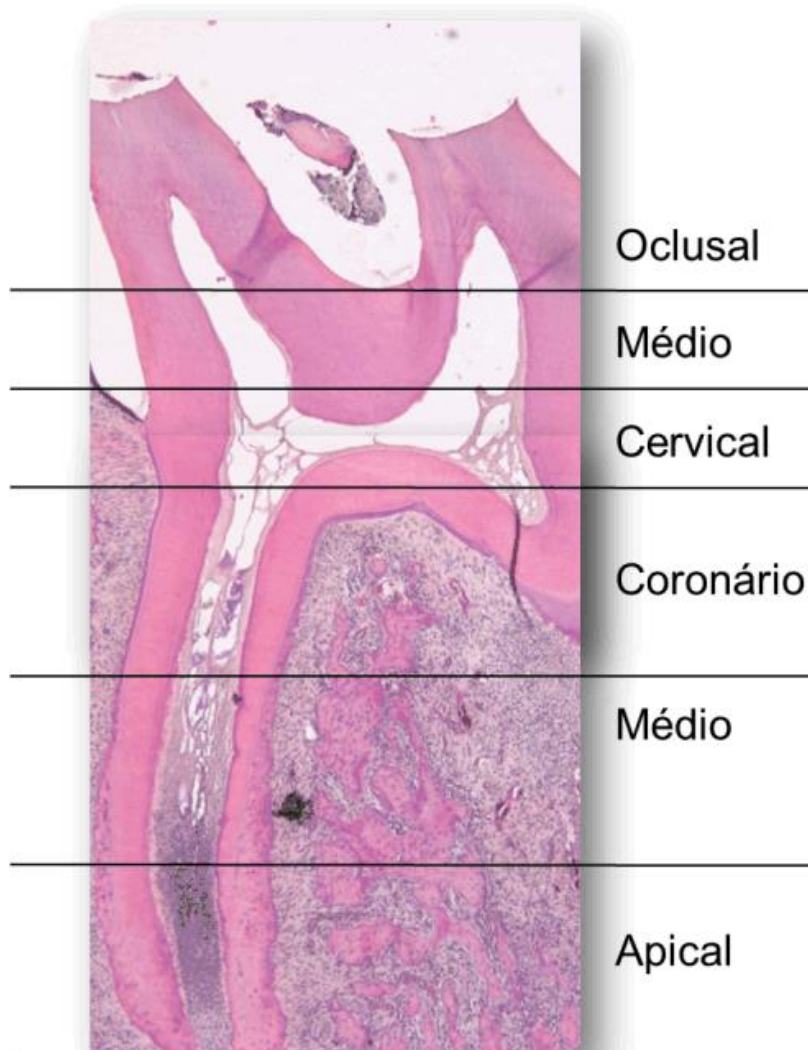
Os escores atribuídos em cada terço foram:

- 1 – Células inflamatórias ausentes ou em número desprezível;
- 2 – Infiltrado inflamatório discreto (menos de 25 células por campo);
- 3 – Infiltrado inflamatório moderado (entre 25 e 125 células por campo);
- 4 – Infiltrado inflamatório severo (mais que 125 células por campo) ou necrose.

A avaliação microscópica foi efetuada por 3 observadores sem que soubessem quais grupos estariam avaliando e, depois de um consenso, determinaram os escores para cada espécime.

Com a finalidade de facilitar a atribuição dos escores e tornar esse ato menos subjetivo, a câmara pulpar foi subdividida em terços (Oclusal, Médio e Cervical), assim como a polpa radicular (Coronário, Médio e Apical), conforme ilustração contida na Figura 4. Assim, nos propusemos a analisar, além dos terços da coroa, os terços da raiz de cada elemento dentário clareado. Desta forma, foi possível uma análise comparativa entre os grupos, considerando a intensidade e extensão do processo inflamatório.

Figura 1 – Divisão em terços da câmara pulpar e canal radicular.



4. Resultados

GRUPO CONTROLE

Observou-se tecido pulpar com aspectos de normalidade denotando homeostasia pulpar. As estruturas pré-dentinária e dentina apresentaram-se íntegras e dispostas em continuidade com a camada de odontoblastos, também organizada. Poucas células inflamatórias estavam dispersas e ao acaso, caracterizando ausência de inflamação. Os vasos sanguíneos apresentaram-se congestionados e a densidade do fibrosamento caracterizou polpa jovem com potencial de reparo. O cemento, ligamento e osso alveolar apresentaram-se íntegros e isentos de processo inflamatório ou reabsorção. A inserção conjuntiva e o epitélio juncional demonstraram aspectos de normalidade e integridade tecidual. Este grupo serviu de parâmetro para a análise dos demais, onde o comprometimento das estruturas dentárias, de suporte ou sustentação foi avaliado.

GRUPO 1 – uma sessão de clareação

Observou-se em todos os espécimes alterações significativas junto à coroa dentária. Na maioria dos espécimes observou-se necrose junto aos cornos pulpares e em 2 casos havia infiltrado inflamatório severo. No terço médio foi observada necrose em 3 espécimes, área de intenso infiltrado inflamatório em 5 espécimes e apenas 2 com infiltrado inflamatório moderado. No terço cervical da polpa coronária, a maior parte dos espécimes não apresentou inflamação, sendo em apenas 3 espécimes notada a presença de infiltrado inflamatório discreto. As polpas radiculares de todos os espécimes deste grupo não apresentaram áreas de infiltrado inflamatório.

GRUPO 2 – duas sessões de clareação

Os espécimes do grupo 2 apresentaram necrose nos terços oclusal e médio da polpa coronária. Já no terço cervical, 5 espécimes apresentaram infiltrado inflamatório moderado nesta região, e os outros 5, infiltrado inflamatório severo.

Também foram observadas áreas de infiltrado inflamatório moderado no terço coronário da polpa radicular dos mesmos espécimes que apresentaram infiltrado inflamatório severo no terço cervical da polpa coronária. Nos demais espécimes foram encontradas áreas de infiltrado inflamatório leve na região coronária da polpa radicular. Os terços médio e apical das polpas radiculares não apresentaram quaisquer áreas de infiltrado inflamatório.

GRUPO 3 – três sessões de clareação

Todos os espécimes deste grupo apresentaram necrose nos terços oclusal e médio da polpa coronária. No terço cervical, a necrose também foi observada em grande parte dos espécimes. Cinco espécimes apresentaram severo infiltrado inflamatório no terço coronário na polpa radicular, 4 apresentaram infiltrado inflamatório moderado, e apenas 1 espécime apresentou infiltrado inflamatório leve nesta região. Já na região de terço médio da raiz, metade dos espécimes apresentou infiltrado inflamatório moderado e o restante, infiltrado inflamatório leve. O terço apical das polpas radiculares dos espécimes deste grupo apresentou áreas de infiltrado inflamatório leve à ausência deste.

GRUPO 4 – quatro sessões de clareação

Toda a região de polpa coronária deste grupo apresentou-se necrosada. O terço coronário da polpa radicular da maior parte dos espécimes deste grupo também apresentou-se necrosado. No terço médio da polpa radicular, apenas 2 espécimes apresentaram áreas moderadas de infiltrado inflamatório, sendo que a maioria apresentou infiltrado inflamatório severo nesta região, e 3 espécimes, necrose. No terço apical, em apenas 3 espécimes foram observadas áreas de infiltrado inflamatório leve, sendo os demais, ausente.

GRUPO 5 – cinco sessões de clareação

Toda região de polpa coronária dos espécimes deste grupo estava necrosada, assim como o terço coronário da polpa radicular. A necrose também pode ser observada no terço médio da polpa radicular de quase todos os espécimes deste grupo. Em 3 espécimes havia infiltrado inflamatório severo no terço médio

radicular. No terço apical, 2 espécimes apresentaram necrose, 4 infiltrado inflamatório severo e os demais, infiltrado inflamatório moderado. Apesar da presença de necrose no terço apical da raiz, não foi observada nenhuma alteração junto ao periápice dentário, em nenhum dos espécimes.

Figura 2 – Imagens representativas dos grupos controle e experimentais.

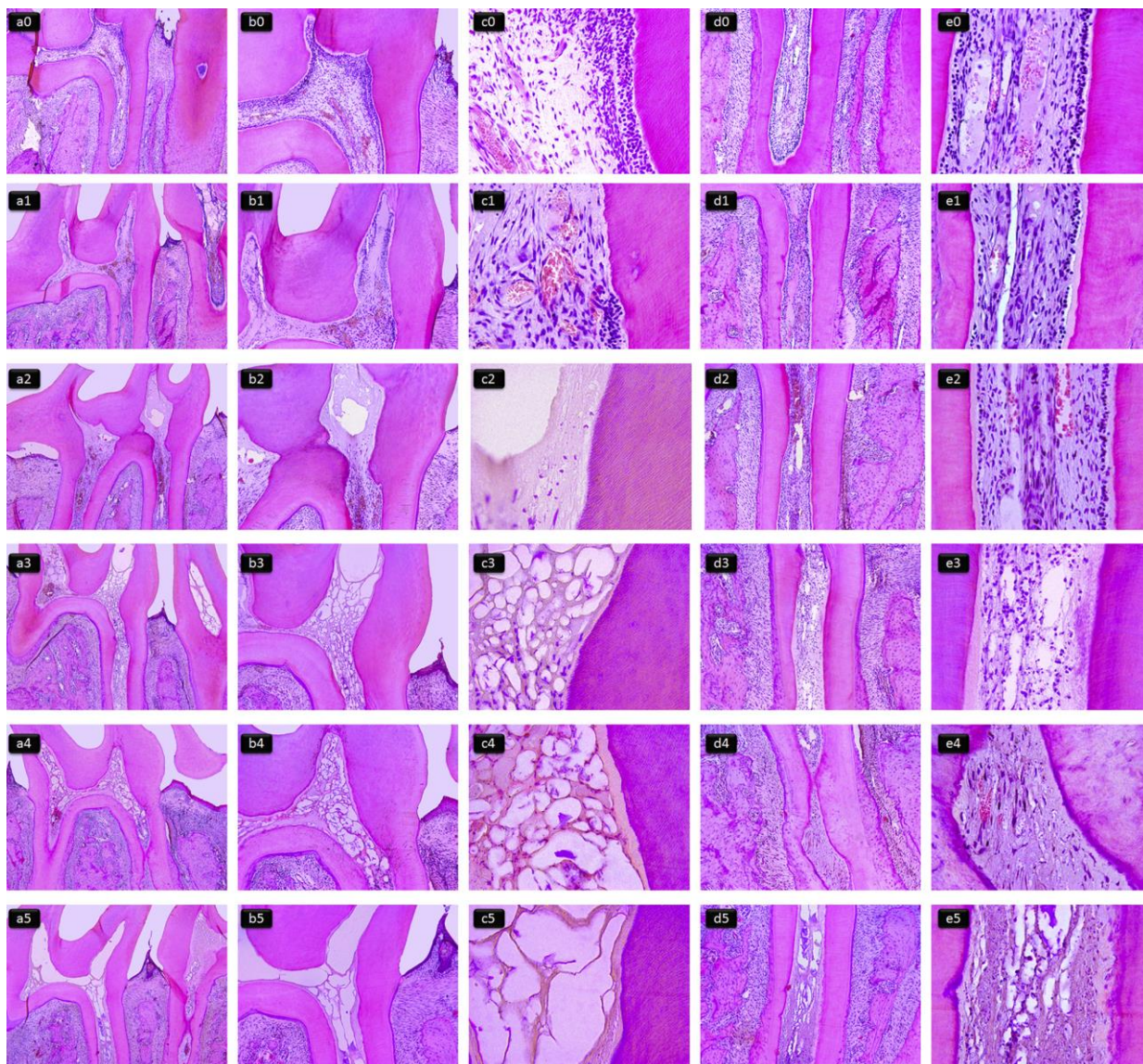


Figura 2. Imagens representativas dos espécimes do grupo controle CG (a0–e0), e dos grupos 1S (a1–e1), 2S (a2–e2), 3S (a3–e3), 4S (a4–e4), e 5S (a5–e5). As imagens representam partes da polpa coronária (a–c) e polpa radicular (d and e), coradas com hematoxilina-eosina. As letras a, b, c, d, e e representam aumentos de 50x, 100x, 400x, 100x, and 400x, respectivamente. Os numeros 0, 1, 2, 3, 4, e 5 representam o número de sessões de clareação.

- ANÁLISE ESTATÍSTICA

Após o ranqueamento por escores, os dados foram submetidos à análise estatística por meio do teste de Kruskal Wallis, seguido do teste de Dunn. Para todas as análises a significância adotada foi de 5% ($p < 0,05$). Os testes estatísticos foram realizados considerando cada terço coronário ou radicular, e esta análise objetivou tornar a avaliação menos subjetiva em função dos resultados observados (Tabela 2).

COM RELAÇÃO À COROA, TERÇO OCLUSAL:

A análise estatística do terço oclusal da coroa dentária demonstrou diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$). A diferença foi observada na comparação entre o grupo controle com todos os outros grupos. Este aspecto denota que o terço oclusal do dente já possui alterações significativas a partir da primeira sessão de clareação.

COM RELAÇÃO À COROA, TERÇO MÉDIO:

A análise estatística do terço médio da coroa dentária demonstrou diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$). A diferença foi observada na comparação entre o grupo controle e grupo 1 com todos os outros grupos. Este aspecto denota que o terço médio da coroa do dente possui alterações significativas a partir da primeira sessão clareadora. Contudo, a realização de mais de uma sessão (G2, G3, G4 e G5) mostrou-se também significativa quando comparada a uma única sessão (G1). Isso revela que a realização de uma sessão clareadora potencializa, ainda mais, a extensão do dano ao tecido pulpar no terço médio da coroa.

COM RELAÇÃO À COROA, TERÇO CERVICAL:

A análise estatística do terço cervical da coroa dentária demonstrou diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$). A diferença foi observada na comparação entre o grupo controle, grupo 1 e grupo 2 com os outros grupos. Este aspecto denota que o terço cervical da coroa do dente possui alterações significativas a partir da segunda sessão clareadora. Contudo, a realização de mais de duas sessões (G3,

G4 e G5) se mostrou também significativa, quando comparada a duas sessões (G2). Isso revela que a terceira sessão clareadora aumenta a extensão do dano ao tecido pulpar no terço cervical da coroa dentária.

COM RELAÇÃO À RAIZ, TERÇO CORONÁRIO:

A análise do terço coronário da raiz dentária demonstrou diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$). A diferença foi observada na comparação entre o grupo controle, grupo 1, grupo 2 e grupo 3 com os outros grupos. Este aspecto denota que o terço coronário da raiz do dente possui alterações significativas a partir da terceira sessão clareadora. Contudo, a realização de mais de três sessões (G4 e G5) se mostrou também significativa comparada a três sessões (G3). Isso revela que a quarta sessão clareadora potencializa ainda mais a extensão do dano ao tecido pulpar no terço coronário da raiz dentária.

COM RELAÇÃO À RAIZ, TERÇO MÉDIO:

A análise estatística do terço médio da raiz dentária demonstrou diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$). A diferença foi observada na comparação entre o grupo controle, grupo 1, grupo 2, grupo 3 e grupo 4, com o grupo 5. Este aspecto denota que o terço médio da raiz do dente possui alterações significativas a partir da quarta sessão clareadora. Contudo, a realização de mais de quatro sessões (G5) se mostrou também significativa comparada a quatro sessões (G4). Isso revela que a quinta sessão clareadora potencializa ainda mais a extensão do dano ao tecido pulpar no terço médio da raiz dentária.

COM RELAÇÃO À RAIZ, TERÇO APICAL:

A análise estatística do terço apical da raiz dentária demonstrou diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$). A diferença foi observada apenas na comparação do grupo 5 com todos os demais grupos. Este aspecto denota que o terço apical da raiz do dente possui alterações significativas a partir da quinta sessão clareadora.

Tabela 2. Escores observados para resposta inflamatória de acordo com os grupos.

Terços	Escores	Sessões de clareação					
		0	1	2	3	4	5
Coroa							
Oclusal	1	10/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
	2	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
	3	0/10	2/10	0/10	0/10	0/10	0/10
	4	0/10	8/10	10/10	10/10	10/10	10/10
	Mediana	1 ^a	4 ^b	4 ^b	4 ^b	4 ^b	4 ^b
Médio	1	10/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
	2	0/10	2/10	0/10	0/10	0/10	0/10
	3	0/10	5/10	0/10	0/10	0/10	0/10
	4	0/10	3/10	10/10	10/10	10/10	10/10
	Mediana	1 ^a	3 ^b	4 ^c	4 ^c	4 ^c	4 ^c
Cervical	1	10/10	7/10	0/10	0/10	0/10	0/10
	2	0/10	3/10	5/10	0/10	0/10	0/10
	3	0/10	0/10	5/10	2/10	0/10	0/10
	4	0/10	0/10	0/10	8/10	10/10	10/10
	Mediana	1 ^a	1 ^a	3 ^b	4 ^c	4 ^c	4 ^c
Raiz							
Coronário	1	10/10	10/10	5/10	1/01	0/10	0/10
	2	0/10	0/10	5/10	4/10	0/10	0/10
	3	0/10	0/10	0/10	5/10	3/10	0/10
	4	0/10	0/10	0/10	0/10	7/10	10/10
	Mediana	1 ^a	1 ^a	2 ^a	3 ^b	4 ^c	4 ^c
Médio	1	10/10	10/10	10/10	5/10	0/10	0/10
	2	0/10	0/10	0/10	5/10	2/10	0/10
	3	0/10	0/10	0/10	0/10	5/10	3/10
	4	0/10	0/10	0/10	0/10	3/10	7/10
	Mediana	1 ^a	1 ^a	1 ^a	2 ^a	3 ^b	4 ^c
Apical	1	10/10	10/10	10/10	10/10	7/10	0/10
	2	0/10	0/10	0/10	0/10	3/10	4/10
	3	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	4/10
	4	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	2/10
	Mediana	1 ^a	1 ^a	1 ^a	1 ^a	1 ^a	3 ^b

Letras iguais indicam que não houve diferença significativa entre os grupos ($P > .05$).

5. Discussão

Da metodologia

Poucos estudos “in vivo” têm avaliado microscopicamente a resposta pulpar ocorrida em decorrência do branqueamento dentário^{12,25,28,29}. A impossibilidade de reproduzir em laboratório, as condições fisiológicas do complexo dentino-pulpar pode gerar diferenças entre os resultados das pesquisas “in vitro” e dos estudos “in vivo”²⁹.

Dentes com polpas vitais possuem componentes que podem impedir ou dificultar a penetração de agentes clareadores através dos túbulos dentinários, como as extensões citoplasmáticas dos odontoblastos e o fluido dentinário, que movimenta-se por meio da pressão intrapulpar³¹. Além disso, a polpa viva possui sistemas de defesa que protegem suas células dos efeitos citotóxicos causados pelo agente clareador, na tentativa de evitar a ocorrência de grandes danos. A polpa possui também vários agentes antioxidantes endógenos, como a catalase e superóxido dismutase, enzimas que promovem a degradação do peróxido de hidrogênio, protegendo as células pulpares dos efeitos citotóxicos do agente clareador³². Dessa maneira, experimentos “in vivo” são os que melhores representam a realidade da técnica de clareação dentária²⁸.

Como modelo experimental neste estudo, foram selecionados ratos da raça Wistar, machos e adultos jovens, por estarem sujeitos a menores variações hormonais que as fêmeas, pelas possíveis alterações no processo de reparo tecidual, conforme o período de ciclo ovulatório em que se encontrassem³³. A utilização de ratos para um trabalho de pesquisa apresenta várias vantagens, tais como: facilidade de manipulação, tempo de vida, facilidade de reprodução, tamanho, peso, custo, armazenagem, alimentação, controle e previsibilidade³⁴.

Outros estudos “in vivo” empregando ratos, para verificar a influência de agentes clareadores na polpa, foram realizados, mas optaram pelo emprego dos incisivos destes animais²⁸. Na presente pesquisa, optou-se pela aplicação do gel clareador nos molares dos ratos, devido à morfologia semelhante à de dentes humanos, no que diz respeito à proporção de esmalte e dentina, enquanto que nos

incisivos de ratos, a proporção de esmalte é bem maior quando comparada a de dentes humanos (cerca de 30% em incisivos centrais humanos e 64% em incisivos de ratos), e a proporção de dentina, menor (cerca de 70% em incisivos centrais humanos e 36% em incisivos de ratos)^{35,36}.

Apesar das dimensões dos dentes dos ratos serem menores, a utilização de grupos controle permite identificar a degradação e destruição do tecido pulpar dos grupos experimentais em proporções relativas às originais. Na literatura foram encontrados poucos estudos que avaliaram histologicamente a polpa após clareação “in vivo” em dentes de ratos, que foi o objetivo deste estudo, identificando alterações morfológicas e estruturais do tecido pulpar e do estado de homeostasia deste tecido, de acordo com o número de sessões de clareação.

Dos resultados

O agente clareador possui como princípio ativo o peróxido de hidrogênio, que tem poder oxidante indireto, uma vez que libera oxigênio à medida que penetra pela estrutura dentária³⁷. Essa capacidade de atravessar esmalte e dentina se dá em função da permeabilidade destes substratos, do baixo peso molecular dessas substâncias^{38,39} e pelo fato do peróxido de hidrogênio desnaturar proteínas, aumentando os canais de difusão deste substrato⁴⁰.

O peróxido de hidrogênio é considerado um agente potente, capaz de degradar qualquer célula, dependendo de sua concentração⁴¹. Este peróxido é bastante instável, e se decompõe rapidamente em oxigênio e água, um processo que é catalisado por um sistema de enzimas presentes em quase todos os fluidos e tecidos do corpo^{42,43}.

Há estudos laboratoriais que demonstram a capacidade de penetração do agente clareador na câmara pulpar^{9,44,45}. Benetti et al. 200⁴⁹ demonstrou que quanto maior a concentração e o tempo de exposição do tecido dentário ao agente clareador, maior será a liberação de espécies reativas de oxigênio. Assim, torna-se importante a avaliação da polpa após clareação dentária, para verificar possíveis danos causados neste tecido devido à oxidação promovida pelas espécies reativas de oxigênio liberadas pelo agente clareador^{10,46-48}. Tais alterações causam efeitos

citopatológicos como mutação, inativação enzimática, fragmentação e degradação protéica^{14-16,23}.

Trindade et al. 2009¹⁴, em um estudo “in vitro”, relataram que gel clareador à base de peróxido de hidrogênio 35% é capaz de se difundir por meio de discos de dentina de dentes bovinos, causando graves danos às células de culturas odontoblásticas. Já Kina et al. 2010⁹, em estudo utilizando pré-molares de humanos e peróxido de hidrogênio a 38%, observaram que o tecido pulpar apresentava características histológicas normais preservadas na maioria dos casos, com ausência de resposta inflamatória, mesmo quando o gel é catalisado por uma fonte de luz halógena. Daqueles que receberam apenas o gel clareador, somente um espécime apresentou discreta desorganização do tecido pulpar. No presente estudo, o tecido pulpar dos ratos, clareados com gel de peróxido de hidrogênio a 35%, apresentaram graves alterações com características de irreversibilidade, sendo em sua maioria, necrose.

As diferenças de resultados entre os estudos de Trindade et al. 2009¹⁴, “in vitro”, e de Kina et al. 2010⁹ “in vivo” e os nossos achados, podem ter relação com a espessura do tecido duro (esmalte e dentina) e das características estruturais dos mesmos, tais como o grau de mineralização, e o número e diâmetro dos túbulos dentinários, que podem influenciar a difusão do gel clareador através do esmalte e da dentina e, conseqüentemente, afetar o tecido pulpar²⁹.

Foi relatado que o complexo dentino-pulpar de diferentes espécies podem responder diferentemente aos mesmos agressores⁴⁹⁻⁵¹, no caso, o agente clareador. Assim, os resultados obtidos em dentes de animais não podem ser extrapolados diretamente para dentes humanos⁵². No entanto, a presença das alterações pulpares, independentemente do modelo empregado, pode indicar a ocorrência de incompatibilidade biológica entre o tratamento realizado e o tecido pulpar, que poderá variar de intensidade conforme o modelo experimental empregado.

Costa et al. 2010¹² ao analisarem a resposta pulpar de incisivos inferiores humanos submetidos a processo de clareação dentária semelhante ao que foi utilizado neste estudo, verificaram que houve presença de grandes zonas de necrose na polpa coronária destes dentes, e tecido pulpar radicular com resposta inflamatória leve. Considerando a semelhança destes resultados com os resultados

apresentados no presente estudo, sugere-se que estudos realizados em molares de ratos podem ser direcionados e aprimorados para prever resultados de procedimentos realizados em incisivos inferiores de humanos.

No presente estudo, o tecido pulpar de grande parte dos ratos apresentou-se totalmente desorganizado, com grandes áreas de necrose por liquefação, até total ausência de células, observada em alguns espécimes do grupo IV e V. Acredita-se que esses danos tenham sido causados devido à penetração do agente clareador, como foi observado em outros estudos já citados anteriormente^{9,44,45}. Acredita-se que a intensa e rápida penetração do peróxido de hidrogênio nos tecidos dentários ultrapassam a capacidade e a velocidade de defesa do tecido pulpar, ocorrendo uma resposta imediata da polpa devido à grande agressão química do agente clareador, que pode ter causado alterações no metabolismo das células, como nos odontoblastos, dificultando ou impedindo a ocorrência dos mecanismos de defesa destas células.

Sacono et al. (2010)⁵³ estudou a citotoxicidade de agentes clareadores a base de peróxido de hidrogênio a 20% e 38% sobre células odontoblastóides de incisivos extraídos de boi, sendo avaliados o metabolismo celular e a morfologia destas células. Os autores observaram redução percentual do metabolismo das células, com diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle. A concentração de peróxido de hidrogênio e número de aplicações do gel clareador parece não ter influenciado, pois, apenas uma aplicação do gel clareador, em ambas as concentrações, foi suficiente para causar redução de mais de 95% do metabolismo celular.

O peróxido de hidrogênio, ao penetrar no tecido pulpar, libera espécies reativas de oxigênio, e os sistemas enzimáticos deste tecido tentam eliminá-las, através de enzimas como a catalase, peroxidase e superóxido dismutase⁵⁴. A superóxido dismutase catalisa a dismutação do radical superóxido (O₂⁻) em oxigênio (O₂) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂), e este é reduzido pela glutathionperoxidase, e pela catalase, ambas enzimas com papel importante na desintoxicação de peróxido de hidrogênio^{42,55-59}. Porém, Cohen & Chase (1979)⁶⁰ e Seale & Wilson (1985)²⁶ acreditam que o problema está no fato de não se saber exatamente a

quantidade de peróxido de hidrogênio que o tecido pulpar é capaz de tolerar sem provocar danos.

No presente trabalho verificou-se que após 48 horas do término do branqueamento ocorreram alterações consideráveis no tecido pulpar. Foram observadas áreas com intenso infiltrado inflamatório, áreas de hemorragia com vasos dilatados e congestos, presença de reabsorções dentinárias, e também, desorganização da camada odontoblástica. Essas alterações foram observadas nos terços médio e cervical da polpa coronária dos ratos do grupo I, sendo que a região de corno pulpar já apresentou-se necrosada com uma única sessão.

A resposta biológica foi se acentuando conforme o número de sessões fosse aumentado. Assim, também observou-se que aqueles espécimes submetidos a 2 sessões clareadoras apresentaram comprometimento da vitalidade nas células presentes nos terços cervical da porção coronária e coronário da porção radicular. O tecido foi sendo cada vez mais comprometido, até o comprometimento de toda a polpa, condição esta presente nos espécimes submetidos a 5 sessões clareadoras.

De forma geral, a literatura demonstra, através de trabalhos “in vitro” e “in vivo”, que a clareação dentária pode resultar em efeitos tóxicos para o tecido pulpar como um todo, causando desde processos inflamatórios discretos e reversíveis até necrose da polpa, mesmo diante das diferentes variáveis utilizadas em cada pesquisa^{9,10,12,14-16,23,25,26,28,29,32,36-38,41,44-51,53,54,60}.

A literatura também mostra que os danos causados pelos agentes clareadores são influenciados de acordo com a concentração de peróxido de hidrogênio, e com o tempo que permanece em contato com o tecido dentário. Neste contexto, o presente estudo colabora, mostrando que a quantidade de sessões de clareação dentária também influencia nesses danos causados à polpa.

Assim, os resultados obtidos com o presente estudo abrem novas perspectivas para o emprego de um modelo experimental em animais, com fácil padronização, para se estudar as alterações que os agentes clareadores podem exercer sobre o tecido pulpar, e ainda, que novas condutas terapêuticas podem ser estudadas com o intuito de se amenizar tal influência.

6. Conclusão

Considerando as limitações do modelo experimental, pode-se concluir que:

- A clareação em dentes de ratos Wistar causa danos à polpa dentária, que são influenciados de acordo com número de sessões de clareação, tornando-os mais elevados à medida que este número aumenta.

Referências

1. Agostinho, F. L. F.; Guimarães, R. P.; Silva, C. H. V. Alterações na microestrutura do esmalte pós-clareamento. *International Journal of Dentistry*, Recife. 2003 jul-dez;2(2):273-8.
2. Araújo, R. M.; Torres, C. R. G.; Araújo, M. A. M. Influência dos agentes clareadores e um refrigerante a base de cola na microdureza do esmalte dental e a ação da saliva na superfície tratada. *Rev Odonto Ciênc*, Rio Grande do Sul. 2006 abr-jun;21(52):118-24.
3. Goldstein, R. E.; Garber, D. A. *Complete Dental Bleaching*. Chicago: Quintessence Books. 1995, 165p.
4. Haywood, V.B.; Heymann, H. O. Nightguard vital bleaching. *Quintessence Int*. 1989;20(3):173-6.
5. Fugaro, J.O.; Nordahl, I.; Fugaro, O.J.; Matis, B.A.; Mjör, I.A. Pulp reaction to vital bleaching. *Oper Dent*. 2004;29:363-8.
6. Ausschill, T. M.; Hellwig, E.; Schmidale, S.; Sculean, A.; Arweiler, N. B. Efficacy, side effects and patients' acceptance of different bleaching techniques (OTC, in-office, at-home). *Oper Dent*. 2005;30:156-63.
7. Buchalla, W; Attin, T. External bleaching therapy with activation by heat, light or laser – a systematic review. *Dent Mater*. 2007;23(5):586-96.
8. Gokay, O.; Yilmaz, F.; Akin, S.; Tunçbilek, M.; Ertan, R. Penetration of the pulp chamber by bleaching agents in teeth restored with various restorative materials. *J Endod*. 2000;26(2):92-4.
9. Benetti, A. R.; Valera, M. C.; Mancini, M. N. G.; Miranda, C. B.; Balducci, I. In vitro penetration of bleaching agents into the pulp chamber. *Int Endod J*. 2004;37(2) 120-4.
10. Kawamoto, K.; Tsujimoto, Y. Effects of the hydroxyl radical and hydrogen peroxide on tooth bleaching. *J Endod*. 2004;30(1):45-50.
11. Haywood, H. B.; Leonard, R. H.; Nelson, C.F.; Brunson, W. D. Effectiveness, side effects and long-term status of nightguard vital bleaching. *J Am Dent Assoc*. 1994;125(9):1219-26.

-
12. Costa, C. A. S.; Riehl, H.; Kina, J. F.; Sacono, N. T.; Hebling, J. Human pulp responses to in-office tooth bleaching treatment. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*. 2010 apr;109(4):e59-64.
 13. Thitinanthapan, W.; Satamanont, P.; Vongsavan, N. In vitro penetration of the pulp chamber by three brands of carbamide peroxide. *J Esthet Dent*. 1999;11:259-64.
 14. Trindade, F. Z.; Ribeiro, A. P. D.; Sacono, N. T.; Oliveira, C. F.; Lessa, F. C.; Hebling, J.; Costa, C. A. Trans-enamel and trans-dentinal cytotoxic effects of a 35% H₂O₂ bleaching gel on cultured odontoblast cell lines after consecutive applications. *Int Endod J*. 2009 Jun;42(6):516-24.
 15. Sies H. Strategies of antioxidant defense. *Eur J Biochem*. 1993;215(2):213-9.
 16. Martindale, J. L.; Holbrook, N. J. Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival. *J Cell Physiol*. 2002;192(1):1-15.
 17. Lee, D. H.; Lim, B. S.; Lee, Y. K.; Yang, H. C. Effects of hydrogen peroxide (H₂O₂) on alkaline phosphatase activity and matrix mineralization of odontoblast and osteoblast cell lines. *Cell Biology and Toxicology*. 2006;22(1):39-46.
 18. Tredwin, C. J.; Naik, S.; Lewis, N. J.; Scully, C. Hydrogen peroxide tooth-whitening (bleaching) products: review of adverse effects and safety issues. *Br Dent J*. 2006;200(7):371-6.
 19. de Lima, A. F.; Lessa, F. C.; Mancini, M. N. G.; Hebling, J.; Costa, C. A. S.; Marchi, G. M. Cytotoxic effects of different concentrations of a carbamide peroxide bleaching gel on odontoblast-like cells MDPC-23. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2009;90(2):907-12.
 20. Bowles, W. H.; Thompson, L. R. Vital bleaching: the effects of heat and hydrogen peroxide on pulpal enzymes. *J Endod*. 1986;12(3):108-12.
 21. Camargo, S. E.; Valera, M. C.; Camargo, C. H.; Mancini, M. N. G.; Menezes, M. M. Penetration of 38% hydrogen peroxide into the pulp chamber in bovine and human teeth submitted to office bleach technique. *J Endod*. 2007;33(9):1074-7.
 22. Coldebella, C. R.; Ribeiro, A. P.; Sacono, N. T.; Trindade, F. Z.; Hebling, J.; Costa, C. A. Indirect cytotoxicity of a 35% hydrogen peroxide bleaching gel on cultured odontoblast-like cells. *Braz Dent J*. 2009; 20(4):267-74.

-
-
23. Lee, D. H.; Lim, B. S.; Lee, Y. K.; Yang, H. C. Effects of hydrogen peroxide (H₂O₂) on alkaline phosphatase activity and matrix mineralization of odontoblast and osteoblast cell lines. *Cell Biology and Toxicology*. 2006;22(1):39-46.
24. González-Ochoa, J. G. Histological changes to dental pulp after vital bleaching with 10% carbamide peroxide. 2002. Dissertação - Indiana University School of Dentistry, Indianópolis, 2002.
25. Seale, N. S.; McIntosh, J. E.; Taylor, A. N. Pulpal reaction to bleaching of teeth in dogs. *J Dent Res*. 1981;80:948-53.
26. Seale, N. S.; Wilson, C. F. G. Pulpal response of bleaching of teeth in dogs. *Pediatr Dent*. 1985;7:209-14.
27. Miranda, C. B. Resposta pulpar de dentes de cães submetidos ao tratamento clareador. 2005. 201f. Dissertação (Doutorado em Dentística) – Faculdade de Odontologia de São José dos Campos da Universidade Estadual Paulista, São José dos Campos, 2005.
28. Frigo, L.; Pallota, R. C.; Meneguzzo, D.; Marcos, R. L.; Penna, S. C.; Lopes-Martins, R. A. B. Avaliação do efeito da clareação dentária fotoativada sobre a polpa dentária em modelo experimental de ratos. *Rev Dental Press Estét*. 2009 jan-mar; 6(1):102-114.
29. Kina, J. F.; Huck, C.; Riehl, H.; Martinez, T. C.; Sacono, N. T.; Ribeiro, A. P.; Costa, C. A. Response of human pulps after professionally applied vital tooth bleaching. *Int Endod J*. 2010 Jul;43(7):572-80.
30. Lillie, R. D. *Histopathologic technique and practical histochemistry*. New York, Blakinston, 2 ed, 501fls, 1954.
31. Hanks, C. T.; Fat, J. C.; Wataha, J. C.; Corcoran, J. F. Cytotoxicity and dentin permeability of carbamide peroxide and hydrogen-peroxide vital bleaching materials, in vitro. *Journal of Dental Research*. 1993;72:931-8.
32. Esposito, P.; Varvara, G.; Murmura, G.; Terlizzi, A.; Caputi, S. Ability of healthy and inflamed human dental pulp to reduce hydrogen peroxide. *European Journal of Oral Sciences*. 2003;111:454-6.
33. Fontes, C. E. R. Estudo do reparo do ferimento de colon de rato com o lado seroso da parede de jejuno, utilizando cianocrilato e cola de fibrina. 2001. 49f. Tese (doutorado em medicina) – Escola Paulista Medicina, 2001.

-
-
34. Penna, L. A. P.; Rode, S. M. Estudo morfológico da polpa de molares de ratos Wistar frente a uma oclusão traumática experimental. *Pesq Odont Bras.* 2000 abr-jun;14(2):159-164.
 35. Lima, H. C. S. M. Efeitos da dieta hipoproteica na formação e composição de estruturas dentárias. Estudo experimental em ratos wistar. 2003. 65f. Tese (mestrado em biuquímica) – Universidade federal do Rio Grande do Norte, 2003.
 36. Sulieman, M.; Addy, M.; Rees, J. S. Surface and intra-pulpal temperature rises during tooth bleaching: an in vitro study. *Br Dent J.* 2005;199(1):37-40.
 37. Oltu, Ü.; Gürgan, S. Effects of three concentrations of carbamide peroxide on the structure of enamel. *J Oral Rehabil.* 2000;27(4):332-40.
 38. Haywood, V. B.; Heymann, H. O. Nightguard vital bleaching: how safe is it? *Quintessence Int.* 1991 july;22(7):515-23.
 39. Baratieri, L. N. Clareamento de dentes vitais, cap 6, p. 31-88, 1996. In: *Clareamento Dental.* Edit. Santos/Quintessence Books, 1996.
 40. McEvoy, S. A. Chemical agents for removing intrinsic stains from vital teeth. I. Technique development. *Quintessence Int.* 1989;20(5):323-8.
 41. Mattos, I. L.; Shiraishi, K. A.; Braz, A. D.; Fernandes, J. R. Peroxido de hidrogênio: importância e determinação. *QuimNova.* 2003;26:373-380.
 42. Bowles, W. H.; Burns, H. Catalase/peroxidase activity in dental pulp. *J Endod.* 1992 nov;18(11):527-9.
 43. Haywood, V. B. Bleaching of vital teeth. *Quintessence Int.* 1997 28(6):424-7.
 44. Bowles, W.; Ugwuneri, Z. Pulp chamber penetration by hydrogen peroxide following vital bleaching procedures. *Journal of Endodontics.* 1987 aug;13(8):375-7.
 45. Ribeiro, A. P. D.; Sacono, N. T.; Lessa, F. C.; Nogueira, I.; Coldebella, C. R.; Hebling, J.; Costa, C. A. S. Cytotoxic effect of a 35% hydrogen peroxide bleaching gel on odontoblast-like MDPC-23 cells. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2009 sep;108(3):458-64.
 46. Li, Y. Biological properties of peroxide-containing tooth whiteners. *Food and Chemical Toxicology.* 1996;34:887–904.
 47. Floyd, R. A. The effect of peroxides and free radicals on body tissues. *The Journal of the American Dental Association.* 1997;128:37–40.

-
-
48. Kanno, S.; Shouji, A.; Asou, K.; Ishikawa, M. Effects of naringin on hydrogen peroxide-induced cytotoxicity and apoptosis in P388 cells. *Journal of Pharmacological Sciences*. 2003;92:166–70.
49. Wennberg, A.; Mjör, I. A.; Hensten-Pettersen, A. Biological evaluation of dental restorative materials – a comparison of different methods. *Journal of Biomedical Materials Research*. 1983;17:23–36.
50. Browne, R. M. Animal test for biocompatibility of dental materials – relevance, advantages and limitations. *Journal of Dentistry*. 1994;22:S21–4.
51. Costa, C. A. S.; Hebling, J.; Hanks, C. T. Current status of pulp capping with dentine adhesive systems: a review. *Dental Materials*. 2000;16:188–97.
52. Costa, C. A. S.; Oliveira, M. F.; Giro, E. M. A.; Hebling, J. Biocompatibility of resin-based materials used as pulp-capping agents. *International Endodontic Journal*. 2003;36:831–9.
53. Sacono, N. T.; Coldebella, C. R.; Ribeiro, A. P. D.; Soares, D. G. S.; Trindade, F. Z.; Hebling, J.; Costa, C. A. S. Efeito Citotóxico de Agentes Clareadores a Base de Peróxido de Hidrogênio a 20% e 38% sobre Células Odontoblastóides. *Rev Odontol Bras Central*. 2010;18(48):15-21.
54. Anderson, D. G.; Chiego-Jr, D. J.; Glickman, G. N.; McCauley, L. K. Clinical assessment of the effects of 10% carbamide peroxide gel on human pulp tissue. *J Endod*. 1999 apr;25(4):247-50.
55. Rotstein, I. Role of catalase in elimination of residual hydrogen peroxide following tooth bleaching. *J Endod*. 1993 nov;19(11):567-9.
56. Rojkind, M.; Domínguez-Rosales, J.; Nieto, N.; Greenwel, P. Role of hydrogen peroxide and oxidative stress in healing responses. *Cell Mol Life Sci*. 2002;59(11):1872-91.
57. Winterbourn, C. C.; Kettle, A. J. Radical-radical reactions of superoxide: a potential route to toxicity. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003;(305):729-36.
58. Canakci, V.; Yildirim, A.; Canakci, C. F.; Eltas, A.; Cicek, Y.; Canakci, H. Total Antioxidant Capacity and antioxidant enzymes in serum, saliva, and gingival crevicular fluid of preeclamptic women with and without periodontal disease. *J Periodontol*. 2007;78(8):1602-11.

-
59. Martins, M. M. R. Influência da atividade física e do ambiente sobre os níveis de glutathionaperoxidase e perfil lipídico em grupo de terceira idade. 2007. Dissertação (mestrado) - Centro Universitario Feevale, Novo Hamburgo, 2007.
60. Cohen, S. C.; Chase, C. Human pulpal response to bleaching procedures on vital teeth. J Endodon. 1979 may;5(5):134-8.

Agradecimento

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, pelo apoio financeiro ao desenvolvimento do projeto, processo 2011/12709-2.