

**UNESP – UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA**

DIANA GABRIELA DE SOUSA SOARES

**CITOTOXICIDADE TRANS-AMELODENTINÁRIA E
ALTERAÇÕES ESTRUTURAIS NO ESMALTE APÓS
CLAREAMENTO COM GÉIS CASEIROS A BASE DE PERÓXIDO
DE CARBAMIDA**

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

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

Araraquara
2010

Soares, Diana Gabriela de Sousa

Citotoxicidade trans-amelodentinária e alterações estruturais no esmalte após clareamento com géis caseiros à base de peróxido de carbamida/ Diana Gabriela de Sousa Soares.– Araraquara: [s.n.], 2010.

116 f. ; 30 cm.

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

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto de Souza Costa

1.Toxicidade 2. Clareamento de dente 3. Odontoblastos 4. Esmalte dentário. I. Título

DIANA GABRIELA DE SOUSA SOARES

**CITOTOXICIDADE TRANS-AMELODENTINÁRIA E ALTERAÇÕES
ESTRUTURAIS NO ESMALTE APÓS CLAREAMENTO COM GÉIS
CASEIROS A BASE DE PERÓXIDO DE CARBAMIDA**

COMISSÃO JULGADORA

DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE

Presidente e Orientador:

PROF. DR. CARLOS ALBERTO DE SOUSA COSTA

2º Examinador

PROFA. DRA. EUNICE TERESINHA GIAMPAOLO

3º Examinador

PROF. DR. MARCELO GIANINI

Araraquara, 16 de novembro de 2010.

Dados Curriculares

Diana Gabriela de Sousa Soares

Nascimento: 29/08/1984. João Pessoa/PB

Filiação: Emanuel Soares de Lima

Giselda Oliveira Sousa de Lima

2002/2007 – Graduação em Odontologia – Universidade
Federal da Paraíba

2008/2010 – Mestrado em Reabilitação Oral, Área de
Concentração Prótese. Faculdade de Odontologia de
Araraquara/Universidade Estadual Paulista

2009/2010 – Estágio de Docência em Prótese Parcial
Removível. Faculdade de Odontologia de
Araraquara/Universidade Estadual Paulista

Dedicatória

A Deus

Por me dar a oportunidade de viver uma vida cheia de alegrias, conviver com pessoas maravilhosas, proporcionar a concretização de meus sonhos, e permitir mais uma oportunidade de evoluir.

Aos meus pais,

Devo a pessoa que sou a vocês, pelo exemplo de vencer na vida por méritos próprios e colocar o estudo como base para o crescimento. Vocês estiveram sempre ao meu lado, me apoiando, me orientando e me dando muito amor. Sem vocês eu não estaria aqui.

Aos meus irmãos, Daniela e Júnior

Por todas as alegrias compartilhadas, pela amizade e amor. Amo vocês!

A Edgard

Meu amor, meu amigo, meu companheiro, meu tudo. Você tornou a minha vida muito mais fácil e muito mais feliz. Simplesmente me completou. Te amo.

Agradecimentos Especiais

Ao meu orientador **Prof. Dr. Carlos Alberto de Souza Costa**, que me recebeu em seu laboratório de braços abertos e sempre me tratou com muito carinho. Para mim você é o exemplo de pesquisador que vou levar para minha vida, onde a ética, integridade, caráter e responsabilidade com a comunidade científica são os requisitos básicos. Agradeço-lhe por todos os ensinamentos e todo o apoio que me foi proporcionado.

À amiga de todos os momentos **Cibele Braga**. Você esteve presente em todas as minhas conquistas, nos melhores e piores momentos da minha vida. Minha irmã de coração, muito obrigado por tudo.

À minha amiga **Ana Paula**, muito obrigado pela amizade e pelos ensinamentos e por ter me dado todo o apoio desde o primeiro dia em que cheguei em Araraquara. Sua presença na minha vida foi

fundamental para o meu crescimento profissional como também para o meu crescimento pessoal. Você é espelho de competência, dedicação e amor ao trabalho. Te adoro muito!

À minha querida amiga **Nancy Sacono**, você é um exemplo de disciplina, coragem, força e superação. Você é única, e sou muito grata a Deus por permitir que eu conhecesse uma pessoa como você e por ter me dado o presente de ser sua amiga. Você marcou minha vida e estará sempre presente nela. Muito obrigado por tudo!

À amiga **Fávia Zardo**, pela sua alegria, espontaneidade e vontade de viver, o que me trouxe muitos ensinamentos. Você foi fundamental nos meus primeiros momentos dentro do laboratório. Foi você quem me chamou para participar do grupo de clareamento, o que resultou na elaboração deste trabalho. Muito obrigado!

A **Mariana Basílio**, amiga querida e companheira que esteve comigo durante todo o mestrado me dando força. Construimos uma amizade verdadeira e única que irá prevalecer por toda minha vida. Muito obrigado pelas palavras carinhosas e por sempre estar disposta a me ouvir.

A **Juliana Pirola**, técnica do Laboratório de Patologia Experimental e Biomateriais da Faculdade de Odontologia de Araraquara, pelo carinho e pela valiosa ajuda na realização dos trabalhos de pesquisa realizados no Laboratório. Muito obrigado!

À família do meu namorado, **Cris, Franzé, Bernard e Gabi**, que me acolheu e me deu amor, carinho e compreensão. Muito obrigado por tudo.

Agradecimentos

À **Faculdade de Odontologia de Araraquara**, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, na pessoa do seu diretor Prof. Dr. José Cláudio Martins Segalla e sua Vice-Diretora, Profa. Dra. Andréia Affonso Barreto Montandon.

Ao **Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese** da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, representados pela Chefe de Departamento Profa. Dra. Regina Helena Barbosa Tavares da Silva e pela Vice-Chefe Profa. Dra. Renata Garcia Fonseca.

À **Coordenação da Pós-Graduação em Reabilitação Oral** da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, representados pelo coordenador Prof. Dr. Carlos Eduardo Vergani e pelo Vice-Coordenador Profa Dra. Ana Cláudia Pavarina.

Ao **Conselho Tecnológico de Desenvolvimento Pessoal** – CNPq, pela bolsa concedida.

Aos **docentes do curso de Pós-Graduação em Reabilitação Oral**, pela valiosa participação em meu crescimento profissional.

À **Profa. Dra. Josimeri Hebling**, Profa. do Departamento de Clínica Infantil da Faculdade de Odontologia de Araraquara, pelas orientações valiosas, e pelo exemplo de competência e dedicação à pesquisa.

À **Profa. Dra. Regina Helena**, Profa do Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese da Faculdade de Odontologia de Araraquara, pelo carinho especial com que sempre me tratou.

À **Profa. Dra. Ana Cláudia Pavarina**, Profa do Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese da Faculdade de Odontologia de Araraquara, por todos os ensinamentos e dedicação especial pelo meu aprendizado.

Aos colegas de curso de mestrado, **Du, Amanda, Mari Basílio, Mari Andrade, Delise, Juliana, Giovana, Larissa, Felipe e Karen**, por compartilharem comigo todas as alegrias e os momentos de stress durante o curso.

Aos colegas do curso de doutorado, **Ana Paula, Cadu, Carol, Ana Lúcia, Fátia, André, Camilinha, Antônio, Cristiane e Fernanda**, por terem me recebido tão bem em Araraquara, e me “adotado” na sua turma.

Aos meus queridos companheiros e amigos do Laboratório de Patologia Experimental e Biomateriais da Faculdade de Odontologia de Araraquara, **Fernanda Basso, Ana Paula Ribeiro, Carol Chaves, Nancy Sacono, Ana Paula Turrioni, Cármen Coldebella, Camila Fávero, Fernanda Vargas, Joyce Bellan, Rafaela Vieira, Ligia Malpelli, Pedro Chaves, Bruno Herrera, Adriano Lima, Cleverton Roberto, Elaine Cristina, Juliana Pirola e Luciana Bianchi**, pelos momentos que vivemos no laboratório e o prazer de aprendermos juntos.

Aos **funcionários da secretaria de Pós-Graduação**, pelos serviços prestados durante todo o curso.

Epígrafe

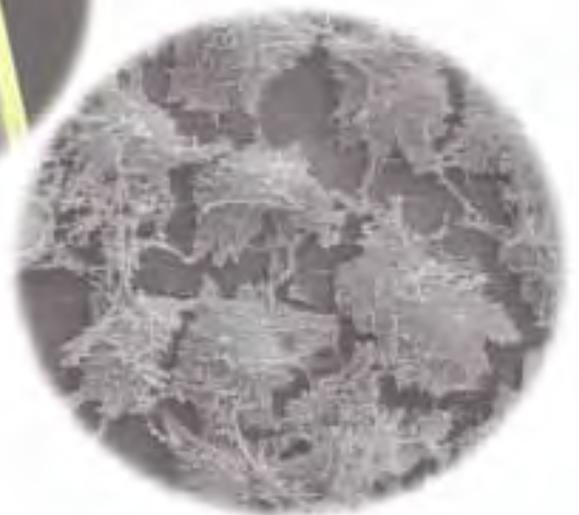
“Se tiver que amar, ame hoje. Se tiver que sorrir, sorria hoje. Se tiver que chorar, chore hoje. Pois o importante é viver hoje. O ontem já foi e o amanhã talvez não venha.”

André Luíz

Sumário

RESUMO.....	14
ABSTRACT.....	17
1 INTRODUÇÃO.....	20
2 PROPOSIÇÃO.....	24
3 REVISÃO DA LITERATURA.....	26
3.1 Técnicas e mecanismos de ação do clareamento em dentes vitais.....	27
3.2 Alterações estruturais no esmalte e dentina relacionadas ao clareamento dental.....	32
3.3 Efeitos dos agentes clareadores em células pulpares.....	44
3.2.1 Penetração de H ₂ O ₂ na câmara.....	44
3.2.2 Citotoxicidade dos géis clareadores.....	49
3.2.3 Alterações histológicas no tecido pulpar.....	55
3.2.4 Respostas moleculares de células pulpares ao H ₂ O ₂	60
4 Material e Método.....	64
4.1 Avaliação da citotoxicidade trans-amelodentinária.....	65
4.2 Avaliação das alterações estruturais no esmalte.....	77
5 Resultado.....	81
5.1 Citotoxicidade trans-amelodentinária.....	82
5.2 Alterações estruturais no esmalte.....	88
6 Discussão.....	92
7 Conclusão.....	103
8 Referencias.....	105

Resumo



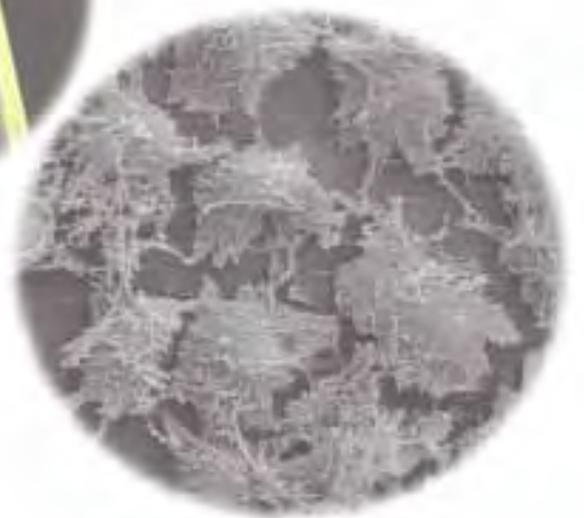
Soares DGS. Citotoxicidade trans-amelodentinária e alterações estruturais no esmalte após clareamento com géis caseiros à base de peróxido de carbamida [dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2010.

Resumo:

No clareamento dental caseiro são utilizados géis clareadores contendo baixas concentrações de peróxido de carbamida (PC). Entretanto, o componente ativo responsável pelo clareamento é o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o qual pode se difundir através do esmalte e dentina e causar efeitos tóxicos sobre células pulpares. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a citotoxicidade trans-amelodentinária de géis clareadores à base de PC sobre células odontoblastóides MDPC-23 após diferentes tempos de contato dos produtos com o esmalte, bem como o efeito do clareamento na estrutura dental. Para avaliação da citotoxicidade, discos de esmalte/dentina obtidos de incisivos bovinos foram adaptados em câmaras pulpares artificiais. Géis clareadores com 10% ou 16% de PC foram aplicados por 8 horas diárias sobre a superfície de esmalte pelos períodos de 1, 7 ou 14 dias. Os extratos (meio de cultura + produtos do gel clareador que se difundiram através do esmalte/dentina) foram aplicados por 1 hora sobre as células em cultura, sendo realizada avaliação do metabolismo celular pelo teste do MTT ($\alpha=5\%$; Anova um critério e teste de Tukey), e da morfologia celular por MEV. Para avaliação das alterações estruturais do esmalte, foi realizada mensuração da microdureza Knoop ($\alpha=5\%$; Anova dois critérios e teste de Tukey) em blocos de esmalte (50g/15s) antes do clareamento e nos períodos de 1, 7 e 14 dias, bem como avaliação da morfologia superficial por MEV. Os resultados não demonstraram diferença significativa para o metabolismo celular entre o grupo controle e nos grupos onde foi aplicado o gel com PC a 10% ($p>0.05$). Já para os grupos clareados com 16% de

PC, foi observado diferença significativa nos períodos de 1, 7 e 14 dias quando comparados ao grupo controle ($p < 0.05$). Não houve diferença significativa quando se comparou os grupos 10% e 16% de PC em todos os períodos experimentais entre si ($p > 0.05$). Com relação à microdureza, foi possível observar diferença estatisticamente significativa entre o grupo clareado com PC 10% e o controle apenas nos períodos de 7 e 14 dias. Para o grupo clareado com PC a 16%, foi possível observar diferença significativa nos períodos de 1, 7 e 14 dias. A análise do esmalte por MEV demonstrou aumento da porosidade nos espécimes clareados com PC a 16%. Portanto, foi possível concluir que, independente do número de aplicações do gel clareador com 10% de PC sobre a superfície de esmalte, o produto não resultou em citotoxicidade trans-amelodentinária para as células MDPC-23. Entretanto, a citotoxicidade ocorreu mesmo após uma única aplicação do gel clareador com 16% de CP sobre o esmalte. As alterações na estrutura do esmalte foram mais significativas quando o clareamento foi realizado com PC a 16%, o que provavelmente determinou uma maior difusão de componentes tóxicos dos géis clareadores pela estrutura dental.

Palavras-chave: Toxicidade; clareamento de dente; odontoblastos; esmalte dentário.



Abstract

Soares DGS. Transenamel and transdental cytotoxicity and changes on enamel structure after tooth bleaching with 10 and 16% of carbamide peroxide gels [dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2010.

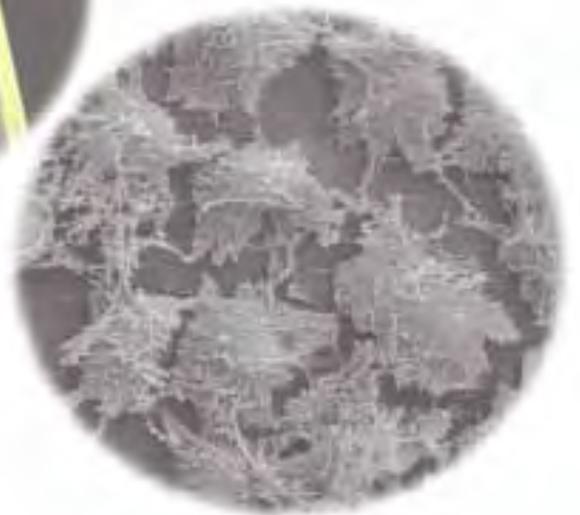
Abstract:

The home bleaching technique uses gels with low concentrations of carbamide peroxide (CP). However, the hydrogen peroxide is the active component and can diffuse by enamel and dentine to cause toxic effects on pulp cells. The purpose of this study was to evaluate the trans-enamel and transdental cytotoxicity of bleaching gels based on carbamide peroxide (CP) on odontoblast-like cells after different contact times of the products with enamel, and the effects of bleaching on the tooth structure. To analyze the cytotoxicity, enamel/dentine discs were obtained from bovine incisors and placed in artificial pulp chambers. Bleaching gels containing 10% or 16% CP were applied for 8 hours/day on the enamel side of the discs during periods of 1, 7 or 14 days. The extracts (culture medium plus bleaching gel products that diffused through the discs) were collected and applied on previously cultured MDPC-23 cells for 1 hour. Cell metabolism was evaluated by the MTT assay ($\alpha=0.05$; one-way ANOVA and Tukey's test), and the cell morphology was analysed by SEM. To evaluate the structural changes on the enamel, the Knoop microhardness was analyzed ($\alpha=0.05$; two-way ANOVA and Tukey's test) on enamel blocks (50g/15s) before and after 1, 7 and 14 applications of bleaching agent, and the morphological surface was analyzed by SEM. There were no significant difference ($p>0.05$) for cell metabolism between the controls and the groups bleached with 10% CP gel. In the groups bleached with 16% CP gel, however, cell metabolism decreased significantly ($p<0.05$) at 1, 7 and 14 days. There was no significant difference ($p>0.05$) among 1, 7 or 14 applications of the gels for either of

the CP concentrations. The microhardness for the groups bleached with 10% CP gel have difference with the control group after 7 and 14 applications. For the groups bleached with 16% of CP, significant difference was observed in all periods analysed. The SEM analysis demonstrate increase in porosity in the specimens treated with 16% of CP. There was possible to conclude that, regardless of the number of applications on an enamel surface, the 10% CP bleaching gel did not cause trans-enamel and transdentinal cytotoxicity to the MDPC-23 cell cultures. However, diffusion of products from the 16% CP gel through enamel and dentine and cytopathic effects to the pulp cells occurred even after a single application of this product on enamel. The enamel modifications were more significant when de 16% CP gel was utilized, generating increase in toxic components diffusion by tooth structure.

Keywords: Toxicity; tooth bleaching; odontoblasts; dental enamel

Introdução



1 Introdução

Na atualidade, o padrão de beleza imposto pela sociedade moderna inclui a necessidade de um sorriso perfeito, o que tem atraído cada vez mais pacientes ao consultório odontológico. Desta forma, a busca por dentes mais brancos tem aumentado de maneira alarmante^{17,42}. O manchamento da estrutura dentária pode ocorrer devido a alterações intrínsecas e extrínsecas, ou ainda por uma combinação de ambas. As alterações intrínsecas estão associadas às modificações moleculares e estruturais do esmalte e dentina, podendo ter origem nas fases pré e/ou pós-eruptiva, como por exemplo, manchas induzidas por traumas, alterações genéticas, medicamentos, fluorose e o próprio processo de envelhecimento do dente⁵⁸. Já as alterações extrínsecas, são superficiais e resultantes da ação de corantes provenientes dos alimentos e da nicotina, os quais se depositam sobre a superfície do esmalte⁷⁹.

Existem diversas opções de tratamento para alterações de cor da estrutura dental, como polimento, microabrasão do esmalte, facetas de resina e cerâmica, confecção de coroas totais estéticas e o clareamento das estruturas dentárias. O clareamento dental é o procedimento que atrai maior interesse entre os dentistas e pacientes, por ser considerado uma técnica simples e não-invasiva^{17,43,81}. Dentro do campo da reabilitação oral, este tratamento é bastante útil quando se busca a harmonização entre dentes naturais remanescentes descoloridos com coroas estéticas. Esta técnica também é de grande utilidade antes da realização de facetas laminadas quando o dente encontra-se muito escurecido, como no caso do manchamento severo por tetraciclina ou fluorose. Como as facetas são muito finas, a cor escurecida do elemento dental subjacente pode transparecer, prejudicando desta forma a estética. A utilização da técnica

do clareamento dental antes de tais procedimentos permite a obtenção de um resultado bastante satisfatório⁷⁶.

Na literatura, estão descritas diferentes técnicas de clareamento dental, onde são utilizados agentes clareadores com diferentes concentrações dos componentes ativos, os quais são aplicados sobre o esmalte de variadas formas e por tempos distintos⁵. As técnicas mais difundidas e utilizadas pelos dentistas atualmente são o clareamento de consultório, que utiliza peróxido de hidrogênio (H_2O_2) ou peróxido de carbamida (PC) em altas concentrações, e o clareamento caseiro, que utiliza géis com baixas concentrações de PC⁸⁰. A técnica de consultório é bastante utilizada em dentes com severa alteração de cor ou quando um tratamento rápido é desejado, sendo com muita frequência realizado associado à aplicação de calor ou luz, cujo objetivo é acelerar os efeitos do peróxido de hidrogênio (H_2O_2)⁹. Outra modalidade para o clareamento de dentes vitais que tem crescido na atualidade são os produtos disponíveis diretamente ao consumidor (over the counter - OTC), sendo utilizados os mesmos componentes ativos dos produtos utilizados no clareamento caseiro e de consultório. No entanto, esse tratamento não é realizado sob supervisão do dentista²¹.

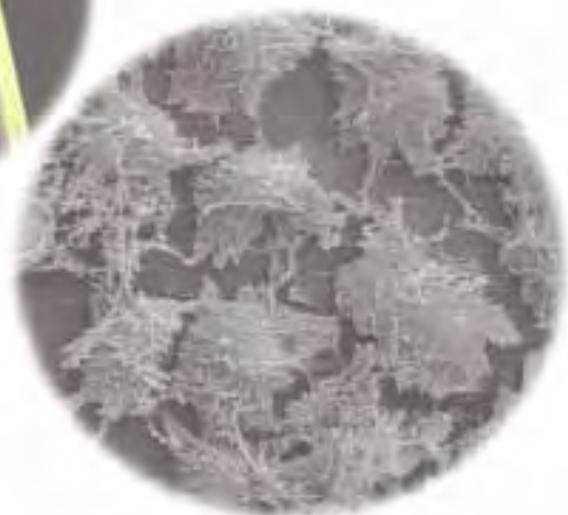
Devido às suas propriedades reativas, o H_2O_2 é o principal componente ativo da maioria dos agentes clareadores que têm sido usados no clareamento dentário⁸¹. Desde então, esta molécula tem sido alvo de pesquisas quanto aos seus possíveis efeitos adversos nos tecidos bucais, particularmente por ser uma molécula termoinstável, com alto poder oxidativo e capacidade de se dissociar em radicais livres, tais como íons hidroxila⁴⁵.

Já foi demonstrado que o clareamento dental causa efeitos adversos nas diferentes estruturas dos dentes, como diminuição da microdureza do esmalte, aumento da sua porosidade, perda de minerais como cálcio e fósforo e sensibilidade dental^{12,24,50,54,61,78}. A sensibilidade dental é efeito adverso mais relatado pelos pacientes após a realização

do clareamento, a qual tem sido relacionada com a capacidade de penetração do H_2O_2 pela estrutura dental, devido ao seu baixo peso molecular, e possível atuação sobre o tecido pulpar^{54,77}. Qualquer produto ou componente de material dental capaz de se difundir através dos tecidos duros do dente terá o odontoblasto como primeira célula alvo para exercer seus possíveis efeitos deletérios. Desta forma, esta célula típica da polpa que se organiza em monocamada para revestir internamente a dentina, pode ser diretamente agredida pelos componentes dos géis clareadores capazes de atravessar o esmalte e a dentina para atingir a polpa subjacente^{19,20}.

Para receber o selo de aprovação pela ADA (American Dental Association), é necessário que o produto clareador seja avaliado quanto à sua eficácia, potencial de causar alterações na morfologia e dureza do esmalte, cinética de liberação do ingrediente ativo, bem como dos possíveis efeitos tóxicos aos tecidos orais¹. Até este momento, apenas um gel clareador caseiro com 10% de peróxido de carbamida na sua composição recebeu o selo de aprovação da ADA². Desta forma, pouco se conhece sobre os agentes clareadores e seus mecanismos de ação sobre os tecidos dentais. Assim, torna-se importante, neste momento, avaliar os efeitos dos agentes clareadores nos tecidos orais para que se possa determinar um protocolo que apresente sucesso clínico, sem contudo causar danos significativos aos dentes submetidos a este procedimento operatório.

Proposição



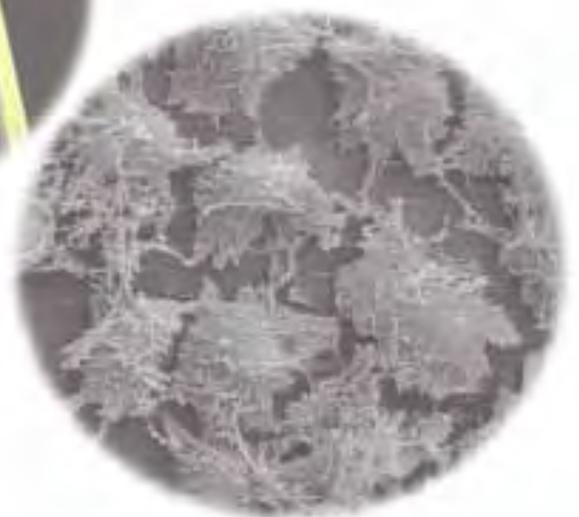
2 Proposição

Os objetivos do presente estudo foram:

1. Avaliar a citotoxicidade trans-amelodentinária de géis clareadores com 10 ou 16% de peróxido de carbamida em células odontoblastóides MDPC-23 após diferentes períodos de aplicação do produto na superfície de discos de esmalte/dentina adaptados em câmaras pulpares artificiais;

2. Avaliar a microdureza e a morfologia superficial do esmalte dental submetido ao clareamento com gel contendo peróxido de carbamida a 10 ou 16% aplicado por diferentes períodos.

Revisão da Literatura



3 Revisão da Literatura

Com objetivos didáticos, esta revisão de literatura abordou três aspectos separadamente. O primeiro referiu-se às diferentes técnicas de clareamento dental e ao mecanismo de ação dos agentes clareadores em dentes vitais; o segundo abordou os estudos que avaliaram as alterações estruturais relacionadas ao clareamento no esmalte e na dentina; e o terceiro aspecto relacionou-se com os efeitos do clareamento dental sobre células pulpares.

3.1 Técnicas e mecanismos de ação do clareamento em dentes vitais

Os primeiros relatos sobre o clareamento dental surgiram no século XIX, cujo objetivo era clarear dentes despulpados. Diversas substâncias foram utilizadas, como cloro, iodo, cianeto de potássio, hipoclorito de sódio e perborato de sódio^{47,48}. O primeiro relato da utilização do peróxido de hidrogênio (H₂O₂) objetivando o clareamento dental foi realizado por Fisher²⁸, em 1910, sendo descrita uma técnica que utilizava solução de H₂O₂ a 30% para o clareamento de dentes despulpados e solução a 15% para o clareamento de dentes vitais. Já Ames³, em 1937, descreveu a técnica de clareamento dental que utilizava o H₂O₂ associado à aplicação de calor. Esses procedimentos eram realizados no consultório odontológico, sendo realizada proteção do tecido gengival por serem utilizadas soluções com elevadas concentrações de peróxido. Para o clareamento caseiro, o primeiro relato foi realizado após observação que o

tratamento de injúrias na cavidade oral, em pacientes sob tratamento ortodôntico, com um enxaguatório bucal contendo H_2O_2 resultou no branqueamento dos dentes³⁸. Entretanto, o clareamento dental caseiro apresentou maior impacto e aceitação entre os dentistas com a publicação do trabalho de Haywood, Heyman³⁹, em 1989, sendo descrita uma técnica com agente clareador à base de peróxido de carbamida (PC) a 10%, aplicado em moldeiras individualizadas por longos períodos. Esta técnica ficou conhecida como “night guard vital bleaching technique”, pois a moldeira era geralmente utilizada no período da noite. Segundo os autores, este tratamento clareador era conservador e deveria ser considerado a primeira alternativa para se tratar dentes levemente manchados. No entanto, com o objetivo de se realizar um clareamento de forma rápida, na década de 90 foi introduzida a técnica utilizando géis com 30% de H_2O_2 associado a fontes luminosas, conhecida como “power bleaching”. Estes géis apresentavam a vantagem de serem facilmente manipulados, especialmente quando comparados aos agentes clareadores líquidos utilizados anteriormente⁷⁴.

Atualmente, diferentes técnicas estão disponíveis para o clareamento dental, onde géis clareadores com distintas concentrações de seu componente ativo são aplicados por variados períodos de tempo sobre o esmalte⁵. Duas técnicas básicas têm sido utilizadas: o clareamento caseiro supervisionado e o clareamento de consultório, ou ainda a combinação das duas técnicas.

Na técnica de clareamento caseiro, são utilizados géis clareadores à base de PC com concentrações variando de 10 a 22%. Primeiramente é realizada moldagem dos dentes do paciente, obtendo-se um modelo em gesso das arcadas. Em seguida é realizado alívio com cera na superfície vestibular dos dentes no modelo, para posterior confecção da moldeira de acetado. Desta forma, uma fina camada do gel clareador é aplicada na moldeira na região correspondente à face vestibular dos dentes a serem clareados, e o paciente é orientado a utilizar a moldeira pelo período de 6

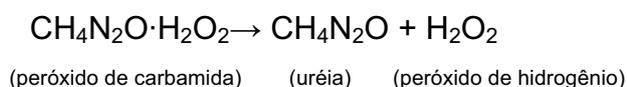
a 8 horas, geralmente durante a noite⁸⁰. A utilização do gel durante a noite apresenta a vantagem de menor interferência da saliva, pela diminuição do fluxo salivar durante o sono, bem como o horário noturno é mais facilmente aceito pelos pacientes para realizar este tipo de tratamento. O período de aplicação do gel varia de uma a três semanas, dependendo da necessidade estética do paciente. Esta técnica é realizada sob a supervisão do dentista e é considerada um método eficaz e seguro, sendo a mais utilizada nas últimas décadas⁶⁷. Até o momento atual, apenas o PC a 10% recebeu o selo de aceitação pela American Dental Association (ADA), fato este que confirma a segurança e eficácia do clareamento dental caseiro².

No clareamento de consultório são utilizados géis clareadores com elevadas concentrações de H₂O₂ (15-38%) ou PC (35-40%), associado ou não a fontes de luz. Esta técnica é bastante aplicada, sendo uma alternativa ao clareamento caseiro, especialmente no caso em que há manchamento severo da estrutura dental, bem como quando o paciente procura por um tratamento com resultados rápidos. Devido à elevada concentração de H₂O₂, há a necessidade da proteção do tecido gengival próximo a região cervical dos dentes a serem clareados, o que é realizado com uma resina fotoativada, denominada de barreira gengival. Em seguida, o agente clareador é aplicado na superfície vestibular dos dentes pelo período recomendado pelo fabricante, geralmente 15 minutos, sendo realizada até três aplicações em cada sessão, dependendo da intensidade da coloração dos dentes a serem clareados⁷⁴. Com o objetivo de acelerar o processo de clareamento dos dentes, tem sido proposto que o agente clareador seja adicionalmente ativado através de sua irradiação por luz. Diversos tipos de luz podem ser utilizadas, tais como a luz azul proveniente de lâmpada halógena, de lâmpada de arco de xenônio, diodo emissor de luz (LED) e laser. Tem sido relatado que o mecanismo de ação da luz na maior eficácia do clareamento baseia-se na termocatálise, resultando em aumento da decomposição do H₂O₂ em cerca de 2 vezes,

com uma elevação da temperatura em 10°C. Apenas uma pequena parte da energia proveniente da luz é convertida em calor, e para aumentar essa conversão vários agentes clareadores tem sido misturados com corantes para aumentar a absorção de luz. No entanto, o aumento na eficácia do clareamento ativado por luz não está bem documentado na literatura, sendo que dados científicos mais recentes indicam que os benefícios da fotoativação no clareamento dental são limitados⁹.

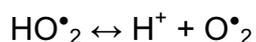
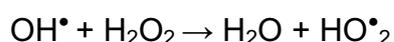
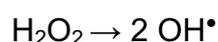
Na atualidade, outra modalidade de tratamento para clarear os dentes tem se tornado popular. São os produtos disponíveis diretamente ao consumidor (Over-the-counter – OTC), os quais podem ser encontrados e comprados em farmácias, supermercados ou pela internet, sendo utilizados sem a supervisão do dentista. Estes produtos surgiram nos Estados Unidos no início do século 21 como alternativa para o tratamento de dentes manchados, apresentando baixo custo comparado ao tratamento tradicional supervisionado²³. O componente ativo é o mesmo utilizado no clareamento tradicional, sendo utilizados o PC (10 a 18%) e o H₂O₂ (1,5 a 14%), e estão disponíveis em diversas formas de apresentação, como fitas clareadoras, vernizes, géis, líquidos “para pintar” (paint-on), enxaguatórios bucais e pastas dentais. Entretanto, esses produtos não oferecem proteção para os tecidos moles adjacentes aos dentes submetidos ao clareamento, e o uso indiscriminado sem a orientação profissional gera preocupação quanto aos possíveis efeitos adversos²¹.

O composto químico ativo dos agentes clareadores utilizados em dentes vitais é o H₂O₂, aplicado diretamente ou a partir da decomposição do PC. O PC (CH₄N₂O·H₂O₂) é o produto de uma ligação fraca entre o H₂O₂ e a uréia. Esta ligação é facilmente quebrada na presença de água, liberando cerca de 33% de H₂O₂^{50,74}, conforme a seguinte reação:



A uréia se decompõe em amônia e dióxido de carbono, os quais são responsáveis por manter o pH alcalino. Em um ambiente alcalino, é necessário uma menor quantidade de energia para formação de radicais livres provenientes do H_2O_2 ⁷⁵. Além desses componentes, o gel contém espessantes, como o carbopol, que apresenta a função de retardar a degradação do PC e possibilitar a liberação gradual de H_2O_2 . Essa técnica tem como objetivo a liberação do H_2O_2 de forma gradativa durante algumas horas, a fim de evitar danos pulpares e periodontais³⁹.

O mecanismo de ação do clareamento dental ainda não foi completamente elucidado. Entretanto, sabe-se que o H_2O_2 é uma molécula instável devido a presença de dois oxigênios ligados entre si (HOOH), os quais são eletronegativos “roubando” os elétrons das moléculas de hidrogênio. Como cargas iguais se repelem, a ligação entre eles é fraca. A quebra da ligação entre as moléculas de oxigênio resulta na formação de radicais livres e espécies reativas de oxigênio (EROs), que são moléculas altamente reativas. As EROs mais comumente formadas são os íons hidroxila (OH^\bullet), peridroxil (HO^\bullet_2) e superóxido (O^\bullet_2). A formação destas moléculas está demonstrada nas reações abaixo⁷⁴:



A coloração do elemento dental é proveniente de moléculas orgânicas presentes na estrutura do dente que apresentam longa cadeia com duplas ligações e anéis aromáticos, denominadas cromóforos. O mecanismo de ação proposto para o clareamento dental é que o H_2O_2 e as moléculas resultantes da sua degradação penetram pelo esmalte para atingir a dentina subjacente, atuando na quebra das duplas ligações dos

cromóforos, o que resulta na formação de moléculas menores. Desta maneira, a luz passa a ser refletida de maneira diferente nos tecidos duros dos dentes, caracterizando o clareamento dental^{43,74}.

3.2 Alterações estruturais no esmalte e dentina relacionadas ao clareamento dental

O esmalte recobre externamente a coroa dental nos dentes hígidos, sendo considerada a primeira barreira contra a penetração de produtos da cavidade oral em direção à polpa dental. Este tecido é altamente mineralizado, com 97% do seu volume composto por cristais de hidroxiapatita, sendo os 3% restantes caracterizados por água e matriz orgânica. Os cristais presentes no esmalte estão organizados em estruturas denominadas prismas. Os espaços interprismáticos contêm pequenos cristais de hidroxiapatita e matriz orgânica. A dentina é um tecido que se localiza abaixo do esmalte, e apresenta grande quantidade de matriz orgânica rica em colágeno em meio a minerais. Este tecido é composto por túbulos dentinários, os quais contêm no seu interior fluido dentinário e prolongamentos citoplasmáticos dos odontoblastos⁶⁴. Desta forma, tratamentos que proporcionem alterações estruturais nesses tecidos deixam a estrutura dental mais susceptível à penetração de substâncias tóxicas em direção à câmara pulpar.

Existem diversos estudos na literatura avaliando os efeitos do clareamento sobre a estrutura do esmalte e dentina. McCracken, Haywood⁵⁶ (1996) avaliaram a perda de cálcio (Ca) no esmalte dental humano após exposição deste tecido a solução com 10% de PC. Blocos de esmalte obtidos a partir da face vestibular dos dentes foram distribuídos entre grupos controle e experimental. Os blocos do grupo experimental

foram submersos na solução com PC pelo período de 6 horas, e o grupo controle em água deionizada. A quantidade de Ca liberada na solução foi mensurada por espectroscopia de força atômica, sendo observada liberação de $1,061 \mu\text{g}/\text{mm}^2$ após aplicação do PC, a qual foi significativamente maior que o controle ($0,259 \mu\text{g}/\text{mm}^2$). Os autores avaliaram ainda blocos de esmalte imersos por 2,5 minutos em bebida à base de cola, observando-se ausência de diferença significante quando comparado ao grupo tratado com a solução contendo PC. De acordo com os autores, a perda de Ca no esmalte clareado é comparável com a que ocorre nos eventos diários de dissolução deste tecido dental, não apresentando, assim, relevância clínica.

No estudo realizado por Hegedüs et al.⁴⁰ (1999), foi avaliada por microscopia de força atômica a superfície do esmalte após aplicação de dois géis clareadores com 10% de PC e uma solução com 30% de H_2O_2 . Blocos de esmalte, confeccionados a partir da face vestibular de incisivos humanos, foram divididos em três grupos: G1 – gel clareador Opalescence[®] com 10% de PC (Ultradent); G2 – gel clareador Night White[®] com 10% de PC (Discus Dental); G3 – solução com 30% de H_2O_2 . Foram realizadas 7 aplicações consecutivas dos produtos na superfície de esmalte por um período de 4 horas cada, totalizando 24 horas de aplicação. Imagens do esmalte foram obtidas antes e após o procedimento clareador, o que permitiu observar que todos os grupos apresentaram alterações estruturais após o tratamento com os agentes clareadores. No esmalte hígido foram observados sulcos com largura de 0,25 a 10 μm e profundidade de 14 a 70 nm. Nos grupos tratados com PC a 10%, observaram-se maiores irregularidades na superfície e aumento na profundidade (30 a 120 nm) e diâmetro (100 a 750nm) dos sulcos presentes no esmalte. Para o grupo tratado com H_2O_2 , os sulcos apresentaram-se ainda mais profundos (90 a 350 nm).

Potocnick et al.⁶¹ (2000) realizaram avaliação da dureza, microestrutura e conteúdo mineral das camadas superficiais e

subsuperficiais do esmalte submetido ao clareamento com gel clareador caseiro. Diferentes grupos de dentes humanos foram selecionados para este estudo (incisivos, pré-molares e molares), sendo o gel clareador com 10% de PC (Night White[®], Discus Dental) aplicado na face vestibular dos mesmos. Foram realizadas 42 aplicações consecutivas de 8 horas, totalizando 336 horas. Ao final do protocolo clareador, os dentes foram incluídos em resina acrílica, sendo os incisivos seccionados no sentido mesio-distal, e os molares e pré-molares no sentido longitudinal. A microdureza Vickers foi avaliada partindo da superfície do esmalte até a junção amelodentinária a cada 40 µm de distância. O conteúdo de Ca dos mesmos espécimes foram avaliados por meio de microanalisador de sonda eletrônica, e o total de Ca presente do gel clareador foi analisado após cada aplicação por meio de espectroscopia. A morfologia do esmalte foi avaliada por MEV nos mesmos dentes submetidos à análise da microdureza. Os autores não observaram alterações na microdureza em todas as regiões analisadas. Entretanto, a morfologia do esmalte apresentou-se alterada, sendo observadas áreas de erosão e sulcos profundos em direção a dentina, semelhantes à lesão de cárie incipiente. Os autores demonstraram, ainda, a ocorrência de redução significativa do conteúdo de Ca em torno de 15,13% em volume, e presença de concentração elevada destes íons no gel clareador após sua aplicação sobre o esmalte.

As alterações na superfície dental após aplicação de agentes clareadores têm sido relacionadas com o pH ácido destes produtos o que poderia proporcionar uma desmineralização superficial. Desta forma, Price et al.⁶² (2000) realizaram um estudo com o objetivo de avaliar o pH de agentes clareadores com diferentes princípios ativos e com distintas concentrações. Foram avaliados o pH de 26 produtos clareadores disponíveis no mercado, incluindo OTCs, géis clareadores de consultório, géis caseiros e pastas dentais clareadoras. Os autores observaram que o pH dos géis caseiros estava próximo da neutralidade variando de 5,66 a

7,35, com média de 6,48. Para os géis de consultório, o pH médio foi de 5,56, no entanto um produto apresentou pH de 3,67. Para as pastas, o pH médio foi de 6,83 e para os OTCs de 8,22.

A morfologia superficial do esmalte foi estudada por Kwon et al.⁵⁰ (2002), após clareamento com elevadas concentrações de H₂O₂. Blocos de esmalte provenientes de incisivos bovinos foram imersos em uma solução com 30% de H₂O₂ por 1 ou 4 dias, sendo realizada avaliação da morfologia por MEV. Após 1 dia de imersão, a superfície apresentou-se áspera, havendo um maior distanciamento entre os cristais e os poros se tornaram mais evidentes. Após 4 dias, a distância entre os cristais aumentou e a distribuição apresentou-se menos compacta. A superfície do esmalte apresentou-se mais rugosa e uma maior quantidade de poros foi observada. Os autores concluíram que o aumento na porosidade do esmalte clareado foi diretamente proporcional ao tempo de contato com o agente clareador.

Com a proposta de avaliar a influência da saliva nas alterações estruturais do esmalte clareado, Spalding et al.⁷³ (2003) realizaram avaliação por MEV da superfície do esmalte humano in vitro. Foram realizados 3 protocolos experimentais: protocolo 1 – aplicação de um gel com 35% de H₂O₂ (Opalescence Xtra[®], Ultradent) por 20 minutos, associado à luz por 10 minutos; protocolo 2 – realização do protocolo 1 + armazenamento em saliva humana (pH 6.8-7.0) por uma semana, a qual foi substituída a cada 12 horas; protocolo 3 – realização do protocolo 1, seguido de imersão em saliva por 24 horas + aplicação de gel clareador com 10% de PC (Opalescence[®], Ultradent) por 12 horas diárias pelo período de uma semana, intercalado com imersão em saliva por 12 horas. A avaliação por MEV demonstrou que após o protocolo 1 ocorreu aumento na porosidade do esmalte caracterizado por uma grande quantidade de fendas junto aos processos de Tomes. Também foram observadas áreas de erosão em algumas regiões do espécime. Nos espécimes submetidos ao protocolo 2, pôde-se observar um manto granular formado por

partículas e glóbulos arredondados que não foram observados no controle, sendo considerada uma possível área de remineralização. Já nos espécimes tratados com o protocolo 3, foi observada uma superfície plana, brilhante e polida, havendo uma tendência de planificação desta superfície quando comparado ao controle. De acordo com os autores, a saliva apresentou a capacidade de remineralizar o esmalte clareado.

Cavalli et al.¹², em 2004, estudaram a influência de géis clareadores com elevadas concentrações de PC sobre a rugosidade de superfície e susceptibilidade ao manchamento do esmalte dental humano, bem como a morfologia superficial por MEV. Foram avaliados dois géis clareadores com PC, um com 35% (Opalescence Quick[®], Ultradent) e outro com 37% (Whiteness Super[®], FGM), sendo realizadas 4 aplicações de 30 minutos cada na superfície de blocos de esmalte. Entre cada aplicação, os espécimes ficaram armazenados em saliva artificial por 72 horas. Os resultados demonstraram que após a aplicação do gel com 35% de PC a rugosidade superficial do esmalte aumentou de forma significativa quando comparado ao controle. Entretanto, a aplicação do gel com 37% de PC não resultou em diferença significativa da rugosidade quando comparado ao controle. Na avaliação por MEV foram observadas alterações semelhantes para os grupos clareados independente da concentração de PC, sendo observadas áreas de erosão distribuídas de forma irregular, bem como aumento na porosidade do esmalte. As áreas mais afetadas foram as regiões interprismáticas. Os grupos clareados também apresentaram maior susceptibilidade ao manchamento quando comparados ao controle, o que demonstra que o esmalte tornou-se mais permeável após o procedimento clareador.

Acredita-se que as alterações na estrutura dental relacionadas com o clareamento são diretamente proporcionais à concentração do agente clareador. Desta forma, Joiner et al.⁴⁴, em 2004, realizou um estudo com o objetivo de avaliar os efeitos um gel clareador com baixa concentração de H₂O₂ sobre a estrutura dental. Os autores realizaram duas aplicações

diárias de um gel com 6% de H₂O₂ (Xtra Withe[®], Unilever Oral Care) pelo período de 3 minutos na superfície de blocos de esmalte/dentina, provenientes de incisivos e pré-molares humanos. Este protocolo foi repetido durante 14 dias consecutivos. No intervalo das aplicações, os espécimes foram armazenados em saliva artificial com o objetivo de simular em parte as condições da cavidade oral. A microdureza Knoop foi avaliada para o esmalte e a Vickers para a dentina, antes e depois do clareamento. Um gel placebo foi utilizado como controle, sendo realizado o mesmo protocolo descrito para o gel clareador. Os resultados demonstraram que após o procedimento clareador a microdureza do esmalte e da dentina permaneceu inalterada, quando comparados com o valor a dureza inicial para cada espécime, demonstrando desta forma que géis com baixas concentrações de H₂O₂, aplicados por períodos curtos, parecem ser mais seguros para o esmalte e dentina.

Com o objetivo de avaliar a profundidade da desmineralização do esmalte submetido ao clareamento com PC a 10% (Regular[®], Ultradent), Efeoglu et al.²⁵ (2005) realizaram estudo com tomografia microcomputadorizada (μ CT). Para isto, blocos de esmalte provenientes de dentes humanos foram submetidos ao clareamento com o gel em estudo pelo período de 8 horas, seguido de imersão em saliva artificial por 16 horas, durante 15 dias consecutivos. A μ CT foi realizada antes e após o clareamento em cinco regiões partindo da superfície do esmalte em direção a junção amelodentinária. Os resultados demonstraram perda significativa de minerais do esmalte numa profundidade máxima de 50 μ m, não sendo observadas alterações em profundidade no esmalte e tampouco na região da junção amelodentinária. Desta forma, as alterações no esmalte submetido ao protocolo de clareamento caseiro convencional foram limitadas à sua porção superficial.

No estudo realizado por Rodrigues et al.⁶⁵, em 2005, foi realizada avaliação in situ da microdureza do esmalte clareado pela técnica de consultório e caseira, bem como a combinação de ambas. Blocos de

esmalte humanos foram cimentados na face vestibular do 1º molar de voluntários, os quais foram divididos em 4 grupos de acordo com o protocolo de clareamento: G1 – clareamento com técnica de consultório + técnica caseira; G2 – técnica de consultório + técnica caseira com gel placebo; G3 – técnica de consultório com gel placebo + técnica caseira; G4 – técnica de consultório + caseira, ambas com gel placebo. Para a técnica de consultório, foi utilizado um gel com 37% de PC (Whiteness Super[®], FGM), aplicado na superfície de esmalte por 30 minutos seguido de fotoativação por 20 segundos, sendo realizadas 2 aplicações em cada sessão. Foram realizadas 3 sessões com intervalos de uma semana entre elas. A técnica caseira foi realizada com PC a 10% (Whiteness Perfect[®], FGM), aplicado por 6 horas em moldeira de acetado no período da noite, por 21 dias consecutivos. O gel placebo apresentou a mesma composição do gel caseiro, cujo espessante era o carbopol, sem a presença de PC. A microdureza Knoop foi avaliada antes e depois do período experimental. Foram observadas diferenças significantes após os tratamentos instituídos, não sendo observadas diferenças entre as técnicas de empregadas, mesmo com aquela em que foi utilizado o gel placebo. A perda de mineral variou de 3,4 a 6,8%, sendo considerada baixa, e, segundo os autores, clinicamente insignificante devido à possibilidade de remineralização pela saliva e fluoretos.

Lee et al.⁵² (2006), realizaram estudo com o propósito de avaliar a perda de minerais em dentes submetidos ao clareamento com solução contendo elevada concentração de peróxido. Blocos de esmalte provenientes de incisivos bovinos foram imersos em solução com 30% de H₂O₂ (grupo experimental) ou água destilada (grupo controle) pelo período de 120 horas, sendo a solução renovada a cada 24 horas. A quantidade de mineral presente na superfície do esmalte foi avaliada em microanalisador de sonda eletrônica (EPMA) em três micro áreas padronizadas. Os íons liberados na solução também foram quantificados, sendo realizada análise por espectroscopia de emissão atômica. Os

autores encontraram concentração significativa de cálcio (Ca), fósforo (P), zinco, manganês e flúor na solução do grupo tratado com H₂O₂ quando comparado ao grupo controle, sendo o Ca e o P os elementos mais abundantes. Foi observado ainda diminuição significativa do total destes elementos no esmalte clareado com a solução de H₂O₂, onde o Ca foi elemento que apresentou maior dissolução.

Com o objetivo de avaliar alterações na estrutura do esmalte clareado com diferentes concentrações de peróxido, Bistey et al.⁷, em 2007, realizaram análise por espectroscopia infra-vermelha (FT-IR). Blocos de esmalte proveniente de dentes humanos foram submersos em soluções com 10, 20 ou 30% de H₂O₂ por diferentes períodos. A análise por FT-IR foi realizada antes do tratamento e após imersão nas soluções por 30, 60 ou 120 minutos. Desta forma, cada dente serviu como seu próprio controle. Foram detectados dois picos referentes à hidroxiapatita, sendo observadas alterações nesses picos após todos os tratamentos. Essas alterações foram diretamente proporcionais à concentração da solução e ao tempo de imersão.

As alterações no esmalte e na dentina podem variar devido à diferença estrutural desses tecidos. Desta forma, Faraoni-Romano et al.²⁷, em 2008, realizaram estudo para avaliar a microdureza e a rugosidade do esmalte e da dentina radicular após clareamento com diferentes concentrações de PC ou H₂O₂. Blocos de esmalte e blocos de dentina radicular bovinos foram distribuídos em diferentes grupos, sendo realizados os seguintes protocolos de clareamento: PC a 10% (Platinum Overnight[®], Colgate Palmolive) - aplicações diárias por 8 horas durante 21 dias; H₂O₂ a 7,5% (Day White 2[®], Discus dental) - aplicações de 1 hora diariamente durante 21 dias; H₂O₂ a 38% (Opalescence Xtra Boost[®], Ultradent) - aplicações semanais por 15 minutos durante 3 semanas; H₂O₂ a 18% ou PC a 22% (White Speed In-Office Fast[®], Discus dental) - aplicações semanais de 30 minutos durante 3 semanas. Durante o intervalo de aplicações, os espécimes ficaram armazenados em saliva

artificial, a qual foi composta por solução remineralizante. Para os espécimes de dentina radicular, foi observada redução significativa da microdureza Knoop, sendo o grupo tratado com PC a 10% o que apresentou os menores valores de redução, diferindo significativamente dos demais grupos, e aumento significativo da rugosidade superficial para todos os grupos. Para os espécimes de esmalte, os autores observaram aumento significativo da microdureza Knoop após o clareamento para todos os protocolos instituídos, indicando a ocorrência de remineralização do esmalte, não sendo observada alterações na rugosidade após os tratamentos. Segundo os autores, a saliva atuou na remineralização do esmalte, o que resultou nos maiores valores de microdureza pós-clareamento.

No estudo realizado por Sasaki et al.⁶⁷ (2009), foram avaliadas as alterações estruturais resultantes do clareamento com produtos contendo baixas concentrações do componente ativo aplicados por períodos reduzidos na superfície de esmalte. Foram confeccionados espécimes de esmalte humano, os quais foram clareados com PC a 10% (Colgate Platinum[®], Colgate Pamolive) ou com H₂O₂ a 7,5% (Day White 2Z[®], Discus Dental) pelo período de 1 hora durante 3 semanas consecutivas. Os autores realizaram avaliação da microdureza Knoop e da micromorfologia superficial por MEV. A avaliação da microdureza foi realizada antes, após o tratamento e 14 dias pós-tratamento, sendo que neste caso os espécimes ficaram armazenados em saliva artificial. Os autores não observaram diferença estatisticamente significativa da microdureza após o período de 3 semanas de tratamento, sendo observado aumento significativo da microdureza 14 dias pós-tratamento, indicando que ocorreu remineralização da superfície do esmalte. A análise em MEV demonstrou presença de alterações com padrão de erosão para 50% das amostras clareadas com PC a 10% e em 80% das amostras clareadas com H₂O₂ a 7,5%.

Faraoni-Romano et al.²⁶ (2009), realizaram estudo in situ com o objetivo de avaliar a resistência ao desgaste do esmalte e da dentina radicular submetidos ao clareamento com PC a 10% (Whiteness Perfect[®], FGM). Os espécimes provenientes de esmalte ou dentina bovinos foram cimentados a pré-molares de 30 voluntários, sendo realizadas aplicações diárias de um gel com ou sem PC (placebo, composto por carbopol) por 14 dias consecutivos. Os resultados demonstraram que não houve redução significativa da resistência ao desgaste do esmalte entre os grupos que receberam gel com ou sem PC. Entretanto, diferença significativa foi observada para a dentina, ocorrendo um aumento considerável no desgaste superficial. Segundo os autores, como foi realizado um estudo in situ, a presença de cálcio e fosfato na saliva, bem como a presença de fluoretos podem ter aumentado a resistência ao desgaste do esmalte observado no presente estudo. Já para a dentina, o maior desgaste observado pode ser atribuído ao maior conteúdo orgânico deste substrato, apresentando maior porosidade e solubilidade, o que resultou em menor resistência ao desgaste após o clareamento.

Com o propósito de avaliar as alterações da micromorfologia superficial do esmalte clareado com PC a 15% (Opalescence[®], Ultradent), Dudea et al.²⁴ (2009), realizaram estudo de microscopia eletrônica de varredura (MEV). Para tanto, dentes humanos foram divididos em dois grupos, de acordo com o protocolo de clareamento empregado. A superfície vestibular dos dentes foi dividida em quadrantes, sendo que no primeiro grupo foram realizados os seguintes tratamentos em cada quadrante: controle (sem tratamento), aplicação de PC a 15% por 3 horas, aplicação de PC a 15% por 8 horas, aplicação de ácido fosfórico 37% por 40 segundos. No segundo grupo foram realizados os seguintes tratamentos em cada quadrante: controle, aplicação de PC 15% por 3 horas durante 14 dias, aplicação de PC a 15% por 8 horas durante 14 dias, aplicação de ácido fosfórico 37% por 40 segundos. Neste grupo, os dentes ficaram armazenados em saliva artificial durante o intervalo de

aplicação do gel clareador. Os autores observaram que uma única aplicação do gel por de 3 ou 8 horas não resultou em alterações superficiais, apresentando micromorfologia semelhante ao controle. Entretanto, o tratamento por 14 dias consecutivos resultou em áreas com depressões em alguns casos profundas, conferindo aspecto mais variável na superfície do esmalte quando comparado ao controle, o que sugere que esta superfície apresentou-se mais porosa.

No estudo realizado Forner et al.³⁰ (2009), foi realizada análise nanoestrutural da dentina intertubular e peritubular após aplicação de agentes clareadores com elevadas concentrações de PC ou H₂O₂. Para isto, foram utilizados blocos de esmalte/dentina provenientes de dentes humanos, sendo realizados os seguintes tratamentos: 3 aplicações de 30 minutos cada de um gel clareador com 30% de PC (Vivastyle[®], Ivoclar/Vivadent) ou 3 aplicações de 8 minutos cada de gel com 35% de H₂O₂ (Polla Office[®], FDI). Um total de 100 nanoindentações foram realizadas na dentina inter e peritubular em cada espécime, antes e depois de cada tratamento em microscópio de força atômica. Foi observada redução de cerca de 50% na nanodureza da dentina, independente da região avaliada, para os dois tratamentos.

Ushigome et al.⁷⁸ (2009) avaliaram as alterações estruturais do esmalte após tratamento com soluções clareadores em diferentes concentrações. Fragmentos de esmalte bovino foram imersos em soluções com 10 ou 30% de PC ou H₂O₂, pelos períodos de 30 ou 180 minutos. A rugosidade superficial antes e após o procedimento clareador foi avaliada, sendo observado aumento significativo na rugosidade superficial em todos os espécimes. A dissolução do esmalte foi estudada através da mensuração do Ca presente na solução após os períodos experimentais. Todos os grupos apresentaram concentrações significativas deste íon após os protocolos instituídos. A morfologia superficial do esmalte foi analisada por MEV, onde foi observado que após o procedimento clareador o esmalte apresentou-se com áreas de erosão generalizada. O

grau das alterações estudadas foi proporcional à concentração da solução e ao tempo de imersão, sendo que a solução com 30% de H₂O₂ foi a que proporcionou os piores resultados. Além disso, os autores avaliaram a nanodureza superficial e em profundidade do esmalte. Foi observado que, independente do agente utilizado, concentração ou tempo de imersão, redução significativa da nanodureza numa profundidade de 20 µm. Desta forma, os autores concluíram que as alterações estruturais no esmalte pós-clareamento são dependentes da concentração e tipo de agente clareador utilizado, bem como com o tempo de contato com a superfície dental.

Em estudo atual desenvolvido por Soldani et al.⁷² (2010), avaliou-se o efeito do agente espessante presente em géis clareadores com PC na microdureza do esmalte in situ. Blocos de esmalte humanos foram cimentados ao primeiro molar de voluntários, os quais foram submetidos ao protocolo de clareamento que incluía aplicação do produto na superfície dos blocos durante 8 horas diárias por um período de 21 dias. Foram avaliados dois géis contendo 10% de PC (Whiteness Perfect[®], FGM, e Colgate Platinum Overnight[®], Colgate Palmolive) bem como dois géis contendo apenas o agente espessante (carbopol ou poloxamer). A microdureza Knoop foi avaliada antes e após os tratamentos. Os autores observaram que ocorreu redução estatisticamente significativa para todos os grupos após os tratamentos instituídos, entretanto não foi observada diferença significativa entre os grupos experimentais. Desta forma, sugeriu-se que o agente espessante poderia atuar de forma sinérgica com o peróxido na desmineralização do esmalte clareado com agentes contendo PC.

3.3 Efeitos dos agentes clareadores em células pulpare

Este ítem foi dividido em quatro tópicos, com o objetivo de realizar uma apresentação didática dos estudos selecionados. O primeiro tópico abordou os estudos que demonstraram a penetração do H_2O_2 na câmara pulpar; o segundo abordou os trabalhos que avaliaram a citotoxicidade dos géis clareadores em cultura de células; o terceiro agrupou os estudos que avaliaram histologicamente o tecido pulpar in vivo; e o quarto tópico abordou os trabalhos que avaliaram as respostas a nível molecular de células pulpares frente à exposição ao H_2O_2 .

3.3.1 Penetração de H_2O_2 na câmara pulpar

A aplicação do H_2O_2 na superfície de esmalte promove o clareamento da estrutura dental, pela capacidade que esta molécula apresenta de penetrar esse tecido e atingir a dentina subjacente. Como a dentina é considerada como um tecido muito mais permeável que o esmalte, devido aos túbulos dentinários e ao maior conteúdo orgânico, diversos estudos in vitro avaliaram a capacidade de penetração do H_2O_2 na câmara pulpar após aplicação de agentes clareadores na superfície de esmalte.

Bowles, Ugwuneri⁸, em 1987, observaram que o H_2O_2 é capaz de atravessar a estrutura dental e penetrar na câmara pulpar, e que esta penetração aumenta com a aplicação de calor. Neste estudo, dentes humanos anteriores extraídos tiveram a polpa coronária removida e

substituída por solução tampão acetato. Em seguida, a face vestibular dos dentes foi exposta a soluções de H_2O_2 nas concentrações de 1, 10 e 30%, sendo estes dentes mantidos numa temperatura constante de 37 °C por 15 minutos. No grupo controle, o esmalte dental foi exposto a água destilada. Paralelamente, dois outros grupos foram expostos ao agente com 10% de H_2O_2 , sendo que um destes grupos foi mantido a 37 °C e outro a 50 °C para avaliar a influência do calor na penetração do H_2O_2 . A quantificação do H_2O_2 foi realizada por método colorimétrico baseado na reação do H_2O_2 com a enzima peroxidase na presença do corante violeta leucocristal. Os valores de densidade óptica das soluções foram mensurados em espectrofotômetro, e posteriormente comparados com uma curva padrão de H_2O_2 . Os maiores valores de penetração foram observados nas amostras tratadas com H_2O_2 a 30% (25,4 µg), seguidos do H_2O_2 a 10% (5,8 µg) e H_2O_2 1% (1,8 µg). Nas amostras tratadas com H_2O_2 a 10% e calor, a quantidade de peróxido de hidrogênio encontrada no interior da câmara foi equivalente àquela observada nas amostras tratadas com H_2O_2 a 30% (25,5 µg). Os autores concluíram que a penetração de H_2O_2 para o interior da câmara pulpar é significativa após aplicação das soluções clareadoras sobre o esmalte, sendo que a difusão trans-amelodentinária está diretamente relacionada com a concentração da solução e a temperatura aplicada sobre o produto.

No estudo realizado por Cooper et al.¹⁶, em 1992, foi avaliada a penetração de H_2O_2 para o interior da câmara pulpar após uso de géis clareadores com PC ou H_2O_2 na sua composição química. Para isto, dentes anteriores humanos extraídos tiveram suas raízes seccionadas e o tecido pulpar coronário extirpado. A câmara pulpar foi preenchida com tampão acetato e o dente foi submetido ao clareamento com gel à base de PC (10% ou 15%) ou à base de H_2O_2 (5% ou 30%). Toda a coroa permaneceu exposta ao agente clareador a 37 °C durante 15 minutos. A quantificação do H_2O_2 na solução tampão foi avaliada na presença da enzima peroxidase e do corante violeta leucocristal. A penetração de

H₂O₂ foi estatisticamente significante, obtendo-se os seguintes valores de H₂O₂: 3,3µg para o PC a 10%; 4,8µg para o PC a 15%; 10,4µg para o H₂O₂ a 5%; 40,4µg para o H₂O₂ a 30%. Os autores concluíram que a penetração de H₂O₂ para o interior da câmara pulpar está diretamente relacionada com a concentração desta molécula no gel clareador.

Com o objetivo de avaliar a influência da presença de uma restauração na superfície dental clareada na difusão de H₂O₂ para a câmara pulpar, Gökay et al.³³ (2000) realizaram estudo em dentes restaurados ou não com diferentes materiais restauradores e submetidos ao clareamento. Incisivos humanos extraídos foram submetidos à realização de cavidades padronizadas do tipo classe V na face vestibular, as quais foram restauradas com os seguintes materiais: resina composta (RC) (Charisma[®], Heraeus Kulzer GmbH), cimento de ionômero de vidro (CIV) reforçado por resina (Vitremmer[®], 3M) ou compômero (Dyract[®], De Trey Dentistry Konstanz). A câmara pulpar foi preenchida com solução tampão acetato, e a porção coronária do dente foi imersa por 30 minutos nas seguintes soluções clareadoras: 30% de H₂O₂, 35% de PC, 15% de PC e 10% de PC. Após este período, a solução tampão foi removida, e foi realizada a quantificação do H₂O₂ (peroxidase/violeta leucocristal). Os grupos controle foram constituídos por dentes restaurados e íntegros não clareados. A maior penetração de peróxido foi observada nos dentes restaurados e clareados com agentes clareadores com elevadas concentrações do componente ativo. Nos grupos clareados com H₂O₂ a 30% e PC a 35%, houve diferença significativa entre os materiais restauradores, havendo maior penetração nos dentes restaurados com CIV e menor penetração para os dentes restaurados com RC. Não foi observada diferença estatística entre os materiais restauradores para os dentes clareados com PC a 10 ou 15%. Desta forma, segundo os autores, a presença de uma restauração na superfície a ser clareada permite maior penetração de H₂O₂ na câmara pulpar.

Com proposta semelhante, Benneti et al.⁶, em 2004, avaliaram a

influência da presença de restauração de RC na superfície dental submetida ao clareamento, na penetração de H_2O_2 em direção à câmara pulpar. Foram realizadas cavidades padronizadas tipo classe V na superfície vestibular de incisivos laterais bovinos, a qual foi restaurada com resina composta (Durafill[®]; Heraeus Kulzer GmbH). A polpa coronária dos dentes foi removida e substituída por solução tampão acetato. Em seguida, géis clareadores contendo 10% (Opalescence[®], Ultradent) ou 35% de PC (Opalescence Quick[®], Ultradent) foram aplicados na superfície vestibular dos dentes por 60 minutos. Os grupos controles foram constituídos por dentes íntegros e restaurados que permaneceram em contato com água destilada pelo mesmo período de tempo. Foi observada penetração significativa de H_2O_2 para os dentes restaurados em comparação com os dentes íntegros, a qual foi significativamente maior nos grupos clareados com PC a 35% em relação aos grupos submetidos ao clareamento com PC a 10%. A concentração de H_2O_2 encontrada foi de 0,7879 μg para dentes restaurados + PC 35%, 0,2954 μg para dentes restaurados + PC 10%, 0,131 μg para dentes íntegros + PC 35% e 0,0712 μg para dentes íntegros + PC a 10%. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os dentes íntegros clareados com PC a 10% e os controles.

Gokay et al.³² (2005) compararam a penetração de H_2O_2 na câmara pulpar de diferentes produtos clareadores disponíveis diretamente ao consumidor (OTCs). Os autores utilizaram incisivos centrais superiores humanos, os quais foram divididos em cinco grupos: G1 – fita clareadora com 5,3% de H_2O_2 (Crest Whitestrips[®]; Protector e Gamble); G2 – paint on (gel para pintar) com 19% de perborato de sódio (5,3% de H_2O_2) (Crest Night Effects[®]; Protector e Gamble); G3 – paint on com 18% de PC (6,5% de H_2O_2) (Colgate Simple White[®]; Colagate Palmolive); G4 – paint on com 8,7% de H_2O_2 (Colgate Simple White Night[®]; Colagate Palmolive); G5 – grupo controle (água destilada). Os produtos foram aplicados por 30 minutos na superfície de esmalte, sendo em seguida realizada a

quantificação do H_2O_2 que difundiu no tampão acetato por meio do teste violeta leucocristal/peroxidase. Foi observada diferença significativa para todos os grupos, obtendo-se as seguintes concentrações de H_2O_2 : G1 – 0,726 μg ; G2 - 0,175 μg ; G3 - 0,231 μg ; G4 - 0,433 μg . A maior penetração foi encontrada nos grupos cujo agente clareador era à base de H_2O_2 (G1 e G4), enquanto que nos grupos onde o produto clareador era a base de PC ou perborato de sódio, obtiveram-se os menores valores de penetração de H_2O_2 . Segundo os autores, a liberação lenta e gradual do H_2O_2 em agentes clareadores contendo o PC ou o perborato de sódio como componente ativo pode prevenir a penetração desta molécula na câmara pulpar.

No estudo realizado por Camargo et al.¹¹ (2007), foi avaliada a penetração de H_2O_2 na câmara pulpar de dentes humanos e bovinos com ou sem presença de restauração. Cavidades classe V foram preparadas na face vestibular dos dentes, as quais foram restauradas com RC (Esthetic X[®], Dentisply), CIV (Vidrion R[®], SS White) ou CIV modificado com resina (Vitremer[®], 3M). Em seguida, o clareamento foi realizado com H_2O_2 a 38% (Opalescence[®], Ultradent) por 40 minutos, sendo realizada a quantificação do H_2O_2 que se difundiu para a câmara pulpar (teste violeta leucocristal/peroxidase). Os resultados demonstraram que ocorreu maior penetração de H_2O_2 nos dentes humanos do que nos dentes bovinos para todos os grupos. Para os dentes humanos, todos os grupos restaurados diferiram de forma significativa do grupo controle, sendo que os maiores valores de penetração foram observados para os dentes restaurados com CIV modificado por resina. Nos dentes bovinos, diferença significativa foi observada apenas para os dentes restaurados com CIV modificado por resina. Segundo os autores, a maior penetração de H_2O_2 nos dentes humanos pode ser devido à menor espessura de esmalte e dentina em comparação aos dentes bovinos.

A associação da luz no clareamento dental tem sido bastante indicada na atualidade, no entanto, ainda existem controvérsias na

literatura quanto à eficácia e segurança deste protocolo de clareamento. Desta forma, Camargo et al.¹⁰, em 2009, avaliaram a influência da fotoativação do gel clareador na penetração de H₂O₂ para a câmara pulpar. Incisivos laterais bovinos foram selecionados, sendo realizada remoção da porção radicular e preenchimento da câmara pulpar com solução tampão acetato. O clareamento foi realizado com gel contendo 35% de H₂O₂ (Whiteness HP[®], FGM) associado ou não à fotoativação com LED ou Laser Nd:YAG. O gel foi aplicado na superfície vestibular do dente por 20 minutos e fotoativado por 3 minutos. No grupo sem fotoativação, o gel clareador foi aplicado durante 20 minutos. O grupo controle ficou em contato com água destilada pelo mesmo período de tempo. Em seguida, a solução tampão foi removida e colocada para reagir com o corante leucocristal e a enzima peroxidase. Os autores observaram que ocorreu penetração significativamente maior de H₂O₂ nos dentes clareados e fotoativados com LED e Laser Nd:YAG (1,1310 e 2,260 µg, respectivamente) quando comparados ao grupo apenas clareado (0,150 µg). Não foi observada diferença significativa entre os dois tipos de fonte de luz utilizados. Os autores concluíram que a utilização luz no clareamento dental pode aumentar a penetração de H₂O₂ em direção à câmara pulpar.

3.3.2 Citotoxicidade dos géis clareadores.

No início da década de 90, estudiosos desenvolveram dispositivos denominados “câmaras pulpares artificiais - CPAs”, objetivando simular in vitro a situação clínica para avaliar o efeito citotóxico de materiais dentários sobre células pulpares. As CPAs apresentam dois compartimentos, um superior onde são adaptados discos de dentina ou de esmalte/dentina, e um inferior que apresenta perfurações circulares

com o objetivo de permitir o contato do meio de cultura com a superfície pulpar da dentina. Desta forma, quando os géis clareadores são aplicados na superfície oclusal dos discos, os produtos capazes de realizar difusão trans-amelodentinária ou trans-dentinária atingem o meio de cultura, sendo esse meio aplicado nas células em cultura. Hanks et al.³⁵, em 1993, foram os primeiros pesquisadores a publicarem um estudo desta natureza. O objetivo do estudo foi avaliar a citotoxicidade trans-dentinária de géis clareadores com H₂O₂ ou PC, bem como quantificar o total de peróxido capaz de realizar essa difusão. Foram obtidos discos de dentina com 0,5mm de espessura, provenientes da porção coronária de molares humanos. Todos os discos foram submetidos à avaliação da permeabilidade dentinária para distribuição homogênea entre os grupos controle e experimentais. Foram avaliados dois géis clareadores contendo o H₂O₂ como componente ativo (10 e 3%) e 4 géis à base de PC (3 géis com 10% e 1 gel com 15%). Inicialmente, foi realizada avaliação da difusão trans-dentinária do H₂O₂. Para tanto, os discos foram adaptados nas CPAs e a superfície pulpar do disco ficou em contato com solução tampão acetato. Os géis clareadores foram aplicados na superfície oclusal dos discos pelos períodos de 15 minutos, 1 hora ou 6 horas, sendo realizada a quantificação do H₂O₂ presente na solução tampão pelo teste do corante violeta leucocristal/peroxidase. Para avaliação da citotoxicidade, as CPAs com os discos em posição foram posicionadas em compartimentos contendo meio de cultura, de tal forma que o mesmo ficasse em contato com a superfície pulpar do disco de dentina. O procedimento clareador foi realizado pelos períodos de 15 minutos ou 1 hora na superfície oclusal dos discos, da mesma forma descrita anteriormente, obtendo-se desta forma o extrato (meio de cultura + produtos de difusão trans-dentinária dos géis clareadores). O extrato foi aplicado pelo período de 1 hora em fibroblastos (Bal/c 3T3) previamente cultivados, sendo realizada avaliação do metabolismo celular pelo teste do MTT. Os autores observaram que ocorreu difusão significativa de H₂O₂

para todos os produtos avaliados, a qual foi diretamente proporcional à concentração do gel clareador e ao tempo de contato com o disco de dentina. Foi observado ainda redução significativa do metabolismo celular para todos os grupos estudados nos dois períodos avaliados. Para o período de 15 minutos, a redução do metabolismo celular foi de 95,2%, 64,9% e 78,5% respectivamente para os géis com 10% e 3% de H₂O₂ e 15% de PC, e de 64,3%, 59,4% e 42%, para os 3 géis com 10% de PC. No período de 1 hora, a redução do metabolismo celular foi maior ou igual a 90% para todos os grupos.

Com o objetivo de avaliar os efeitos citotóxicos do clareamento com géis clareadores com elevadas concentrações de H₂O₂, Trindade et al.⁷⁷ (2009) utilizaram discos de esmalte/dentina, com espessura semelhante à encontrada em incisivos humanos, os quais foram adaptados em CPAs. As CPAs com os discos em posição foram posicionadas em placas de 24 compartimentos contendo meio de cultura em contato com a superfície dentinária. O gel clareador contendo 35% de H₂O₂ (Whiteness HP[®], FGM) foi aplicado na superfície de esmalte por 15 minutos, associado ou não à irradiação com luz alógena (430 mW/cm²) por 20 segundos. A irradiação foi realizada a 10 mm de distância do disco, sendo o procedimento clareador repetido 3 vezes. Após a última aplicação do gel clareador, foi realizada sua remoção, e as CPAs foram mantidas em incubadora a 37° C por 12 horas. Decorrido este período, o meio de cultura contendo os produtos de difusão trans-amelodentinária do gel clareador, denominado de extrato, foi aplicado em células de linhagem odontoblástica (MDPC-23) previamente cultivadas, pelo período adicional de 24 horas. No grupo controle, não foi realizado qualquer tratamento na superfície do disco. O metabolismo celular foi avaliado pelo teste do MTT, o qual demonstra a atividade da enzima mitocondrial desidrogenase succinica, e a morfologia celular foi avaliada por MEV. Os resultados demonstraram intensos efeitos citotóxicos sobre as células MDPC-23, sendo observado 92% de redução do metabolismo celular no grupo

clareado e 82,5% para o grupo clareado e irradiado, não havendo diferença significativa entre esses dois grupos. A análise por MEV demonstrou que apenas um pequeno número de células permaneceram aderidas à lamínula de vidro, sendo observados restos de membrana celular o que caracteriza a ocorrência de morte celular. As células que permaneceram aderidas apresentaram fortes alterações morfológicas.

De forma semelhante, Coldebella et al.¹⁵, em 2009, realizaram avaliação da citotoxicidade trans-amelodentinária do gel clareador com 35% de H₂O₂ (Whiteness HP[®], FGM), após 5 aplicações consecutivas sobre a superfície de esmalte. Os discos de esmalte/dentina foram adaptados nas CPAs, obtendo-se 3 grupos experimentais: G1 – cinco aplicações do gel clareador por 15 minutos; G2 – cinco aplicações do gel por 15 minutos associada a irradiação com luz halógena (430 mW/cm²) por 20 segundos; G3 – grupo controle sem tratamento. Após a última aplicação, as CPAs foram mantidas em incubadora a 37 °C por 12 horas, obtendo-se o extrato, o qual foi aplicado nas células odontoblastóides, previamente cultivadas, por 24 horas. Foram realizadas avaliação do metabolismo celular pelo teste do MTT, quantificação da proteína total e avaliação da morfologia celular por MEV. Foi observada diminuição significativa da viabilidade celular para G1 e G2 quando comparados ao controle, e o total de proteína celular diminuiu em 93,13% para G1, e 91,8% para G2, não havendo diferença significativa entre esses dois grupos. A análise por MEV demonstrou uma grande diminuição no número de células e a morfologia das células que permaneceram aderidas apresentaram severas alterações.

No estudo realizado por Dias Ribeiro et al.²² (2009) foi realizada modificação na técnica da avaliação da citotoxicidade trans-amelodentinária proposta por Trindade et al.⁷⁷ (2009) e Coldebella et al.¹⁵ (2009). Os autores adaptaram discos de esmalte/dentina em CPAs, no entanto, as células MDPC-23 foram cultivadas na superfície de dentina do disco, aproximando ainda mais o experimento da situação in vivo. Em

seguida o gel clareador com 35% de H₂O₂ (Whiteness HP[®], FGM) foi aplicado na superfície de esmalte associado ou não à irradiação com luz halógena (500 mW/cm²). Os seguintes grupos experimentais foram formados de acordo com o tratamento da superfície de esmalte: G1 – duas aplicações de 15 minutos de gel clareador; G2 – duas aplicações de 15 minutos do gel associado à 20 segundos de irradiação com luz halógena; G3 – aplicação de luz halógena por 20 segundos; G4 – grupo controle (sem tratamento). Após incubação por 12 horas a 37°C e 5% de CO₂, foi realizada avaliação do metabolismo celular pelo teste do MTT. A análise da morfologia celular por MEV foi realizada na superfície dentinária dos discos de esmalte/dentina. Paralelamente, foi avaliada a alteração da temperatura na superfície dentinária após aplicação da luz. Os valores da redução do metabolismo celular para G1, G2 e G3 foram de 31,7%, 41,6% e 11,5%. Foi observada diferença significativa entre G1 e G2 com o grupo controle. Pôde-se observar ainda que a associação entre o clareamento e aplicação de luz resultou em maiores efeitos citotóxicos sobre as células, no entanto esses resultados não foram estatisticamente significantes. Além disso, a aplicação da luz isoladamente resultou em aumento da temperatura da superfície dentinária em 0,4°C, o que resultou em discreta redução do metabolismo celular, porém esta redução não foi significativa. A MEV demonstrou em G1 e G2 um número reduzido de células aderidas ao substrato dentinário e a presença de fragmentos celulares, caracterizando a ocorrência de morte celular. As células que permaneceram aderidas apresentaram profundas alterações na morfologia. Segundo os autores, a aplicação de luz associada ao clareamento é questionável, pelo potencial de maiores danos às células pulpares.

De Lima et al.¹⁸ (2009) avaliaram a citotoxicidade de diluições seriadas de um gel clareador com PC a 10% (Whiteness[®], FGM) aplicadas diretamente nas células odontoblastóides em cultura. Foram realizadas diluições seriadas do gel clareador partindo de 0,1% até

0,0001%, sendo realizada a quantificação do peróxido presente em cada diluição pela técnica do violeta leucocristal/peroxidase. As soluções contendo o peróxido foram aplicadas nas células MDPC-23 previamente cultivadas pelo período de 1 hora. Os autores observaram que ocorreu redução significativa do metabolismo celular nas concentrações de 0,1% e 0,01%, com redução do metabolismo celular de 78% e 38,5%, respectivamente. Para as concentrações de 0,001% e 0,0001%, não foi observada redução significativa do metabolismo celular, onde a concentração de peróxido encontrada foi de 0,2547 e 0,0257, respectivamente.

No estudo de Sacono et al.⁶⁶ (2010) foi avaliada a citotoxicidade trans-amelodentinária de géis clareadores com 20 e 38% de H₂O₂ sobre células odontoblastóides MDPC-23. Foram utilizadas CPAs, sendo o clareamento realizado na superfície de esmalte dos discos de esmalte/dentina conforme a recomendação do fabricante. O gel com 20% de H₂O₂ (Whiteness HP Blue[®], FGM) foi aplicado pelo período de 45 minutos, sendo realizada 1 ou 2 aplicações. Para o gel com 38% de H₂O₂ (Opalescence Xtra Boost[®], Ultradent), foram realizadas 1, 2 ou 3 aplicações de 10 minutos. Após a última aplicação dos produtos, as CPAs foram incubadas a 37°C por 12 horas para obtenção do extrato. O extrato foi aplicado em células MDPC-23 previamente cultivadas por 24 horas. A viabilidade e morfologia celular foram avaliadas pelo teste do MTT e MEV, respectivamente. Foi observado intenso efeito citotóxico, com redução do metabolismo celular de cerca de 96% para todos os grupos, não havendo diferença significativa entre os grupos, independente do número de aplicações e da concentração do gel clareador. A análise por MEV demonstrou a ocorrência de morte celular da maioria das células.

Em estudo recente realizado por Lima et al.⁵³ (2010), foi realizada avaliação da citotoxicidade trans-dentinária de géis clareadores com baixas concentrações de PC, bem como o efeito da aplicação prévia de um anti-oxidante (ascorbato de sódio – AS) na citotoxicidade. Foram

utilizados discos de dentina com 0,5mm de espessura, com o objetivo de simular os efeitos tóxicos trans-dentinários do clareamento caseiro em áreas com exposição dentinária. Os discos de dentina, provenientes de molares humanos, foram testados quanto a sua permeabilidade para distribuição homogênea entre os seguintes grupos: G1 – controle (sem tratamento); G2 – aplicação de AS a 10% por 6 horas; G3 – aplicação de gel com 10% de PC (Whiteness[®], FGM) por 6 horas; G4 – aplicação de AS por 6 horas seguido do gel com 10% de PC por 6 horas; G5 – aplicação de gel com 16% de PC (Whiteness[®], FGM) por 6 horas; G6 – aplicação de AS por 6 horas seguido do gel com 16% de PC por 6 horas. Células MDPC-23 foram semeadas na superfície pulpar dos discos, e imediatamente após a aplicação dos produtos na superfície oclusal, foi realizada avaliação do metabolismo celular (teste do MTT) e a morfologia celular (MEV). Paralelamente, foi realizada quantificação do H₂O₂ capaz de se difundir após aplicação do PC a 10 ou 16% por 6 horas pelo método do corante violeta leucocristal/peroxidase. A aplicação do PC a 16% isoladamente (G5) resultou em 65% de redução do metabolismo celular, a qual apresentou diferença significativa quando comparado ao grupo controle. Para os demais grupos, os valores do metabolismo celular não apresentaram diferença estatisticamente significativa com o controle. A aplicação do AS previamente ao clareamento (G4 e G6) resultou em redução dos efeitos tóxicos, sugerindo a ocorrência de citoproteção devido à atividade antioxidante. Os maiores valores de penetração de H₂O₂ foram observados para o grupo clareado com PC a 16%, sugerindo que a penetração do H₂O₂ é proporcional à concentração do gel clareador com PC.

3.3.3 Alterações histológicas no tecido pulpar

Diversos estudos realizaram avaliações histológicas do tecido pulpar após clareamento dental com diferentes técnicas e produtos,

visando a avaliação da segurança desses procedimentos. Robertson, Melfi⁶³, em 1980, avaliaram a resposta pulpar de pré-molares submetidos ao clareamento com solução contendo H₂O₂ a 35%, associado ou não ao calor. Os dentes foram divididos em 4 grupos: G1 - sem tratamento (grupo controle); G2 - dentes tratados com H₂O₂ 35% associado à aplicação de calor (46 a 51° C); G3 - dentes submetidos à aplicação de calor (46 a 51° C); G4 - dentes tratados apenas com H₂O₂ a 35%. Os tratamentos foram realizados em duas sessões de 30 minutos cada, com intervalo de 4 dias entre elas. Os dentes foram extraídos e preparados para a análise histológica 4 dias após a segunda sessão. Foi observada resposta inflamatória superficial com presença de leucócitos e linfócitos nos dentes dos grupos clareados com H₂O₂, associado ou não ao calor. Não foram observadas diferenças entre o grupo que recebeu aplicação de calor com o grupo controle.

De forma semelhante, Seale et al.⁷¹ (1981), avaliaram o efeito do clareamento com H₂O₂ a 35% associado ou não à aplicação de calor no tecido pulpar em caninos de cães. O clareamento foi realizado em seis animais, sendo utilizados os quatro caninos. Os dentes de cada animal foram tratados da seguinte forma: dente 1 – aplicação do H₂O₂ a 35% por 30 minutos; dente 2 – aplicação do H₂O₂ por 30 minutos intercalado com aplicações de calor (62 °C); dente 3 – aplicação de calor; dente 4 – controle (sem tratamento). O tratamento foi realizado uma vez por semana durante 4 semanas consecutivas. Os dentes foram extraídos após 3, 15 ou 60 dias sendo realizada análise histológica. Nos dentes clareados, submetidos ou não à aplicação de calor, analisados 3 ou 15 dias após realização do procedimento clareador, foi observado no tecido pulpar abaixo da região clareada ausência da camada odontoblástica, denso infiltrado inflamatório, áreas com reabsorção interna da dentina, extravasamento dos vasos sanguíneos e grande quantidade de neutrófilos, situação característica de inflamação aguda. Não foi observada diferença entre os dentes apenas clareados com aqueles

associados com a aplicação de calor. No período de 60 dias, foi observada remissão total do processo inflamatório, e reestruturação da camada odontoblástica. Nos dentes tratados apenas com calor, não foi observada diferença com o grupo controle em todos os períodos analisados. Segundo os autores, os resultados do presente estudo apresentam relevância clínica, pois a espessura de esmalte e dentina nos caninos de cães é semelhante à de incisivos humanos, os quais são os dentes mais requisitados para o clareamento dental, o que demonstra o potencial da geração de alterações importantes no tecido pulpar quando da realização do clareamento com elevadas concentrações de peróxido de hidrogênio em dentes com pequena espessura de esmalte e dentina.

Em busca de um tratamento clareador de consultório seguro e eficaz, Seale, Wilson⁷⁰ (1985) propuseram a determinação de um método de clareamento que causasse o mínimo de danos ao tecido pulpar. O estudo foi realizado in vivo em seis cães que receberam inicialmente administração de tetraciclina. Após a erupção dos dentes permanentes, com manchamento amarelado induzido pela tetraciclina, os dentes caninos de cada animal foram submetidos à aplicação do H₂O₂ a 35% associado ao calor (62 °C) durante 15, 30 ou 45 minutos. Foram realizadas quatro sessões em intervalos de 15 dias em cada grupo, sendo que o grupo controle permaneceu sem qualquer tratamento. Os cães foram sacrificados em períodos de 13, 62 e 92 dias após a última sessão do tratamento clareador e os dentes foram preparados para análise histológica. Verificou-se que, quanto mais longo o período de aplicação do H₂O₂ e calor, mais severas foram as respostas pulpares, evidenciando a formação de dentina reparadora, achatamento dos odontoblastos, hemorragia pulpar e presença de infiltrado inflamatório crônico. Os autores concluíram que os danos causados à polpa são reversíveis, mas contra-indicam tratamentos clareadores por períodos prolongados já que quanto maior o tempo de contato do produto com o esmalte, maior é a sua penetração em quantidade e profundidade.

No estudo realizado por Fugaro et al.³¹, em 2004, foram avaliadas as alterações histológicas no tecido pulpar após realização do clareamento caseiro com PC a 10% (Opalescence[®], Ultradent). Neste estudo foram utilizados pré-molares de voluntários com indicação para extração ortodôntica, os quais foram divididos em 4 grupos, de acordo com o protocolo de clareamento: G1 - dentes submetidos ao clareamento por 4 dias; G2 – dentes clareados por 14 dias; G3 - clareamento por 14 dias seguido de duas semanas sem tratamento; G4 (grupo controle) - sem tratamento. Os pacientes foram instruídos a utilizar o gel clareador em moldeira individualizada por 6 horas diárias no período da noite. Os dentes foram extraídos logo após os períodos experimentais, sendo realizada preparação para análise histológica. Foi observado que 1/3 dos dentes submetidos ao clareamento demonstraram leve reação pulpar, com a presença de leucócitos difusos e irregularidades na camada odontoblástica, no entanto os pacientes não relataram sensibilidade. Em G3, não foram observadas presença de alterações histológicas, apresentando-se semelhante ao controle. Os autores concluíram que o clareamento caseiro com PC a 10% pode causar pequenas alterações pulpares, entretanto elas são reversíveis dentro de duas semanas, sendo desta forma considerado como um tratamento seguro para a polpa dental.

Kina et al.⁴⁶ (2010) realizaram avaliação histológica em pré-molares submetidos ao clareamento com H₂O₂ a 38% associado ou não à aplicação de luz halógena. Os dentes foram submetidos à 3 aplicações consecutivas de 10 minutos cada do gel clareador Opalescent Xtra Boost[®] (Ultradent) com 38% de H₂O₂, associadas ou não à aplicação de luz halógena (480mW/cm²) por 3 minutos. Dentes não clareados e não irradiados compuseram o grupo controle. Os dentes foram extraídos 2 a 15 dias após o procedimento clareador, sendo preparados para avaliação histológica. Não foram observadas alterações significantes nos dentes clareados associados ou não à luz. Alguns dentes apresentaram pequenas alterações na camada odontoblástica e leve reação inflamatória

na região periférica da polpa próxima à áreas submetidas ao tratamento, no entanto não foram significativas.

Já no estudo de De Souza Costa et al.²⁰ (2010), foi realizada comparação dos efeitos do clareamento com altas concentrações de H₂O₂ em dentes anteriores e posteriores. Dezesesseis dentes com indicação para extração por motivos ortodônticos foram distribuídos em 4 grupos: G1 (n=6) – pré-molares clareados; G2 (n=4) – incisivos inferiores clareados; G3 (n=3) pré-molares não clareados; G4 (n=3) – incisivos inferiores não clareados. O protocolo de clareamento seguiu as recomendações do fabricante, sendo realizadas 3 aplicações consecutivas de 15 minutos do gel clareador com 38% de H₂O₂ (Opalescence Xtra Boost[®], Ultradent). Os dentes foram extraídos para análise histológica após 2 dias. Além disso, foi realizada mensuração da espessura de dentina dos dentes em microscópio de luz. Foi observada ausência de alterações histológicas significativas nos pré-molares clareados ou não e nos incisivos não clareados. No entanto, nos incisivos submetidos ao clareamento foram observadas importantes alterações histológicas. Em 3 dentes, o tecido pulpar coronário apresentou uma extensa área de necrose por coagulação e deposição de dentina reacionária e resposta inflamatória moderada na polpa radicular. Em um dente, foi observada intensa deposição de dentina reacionária na polpa coronária e leve reação inflamatória na polpa radicular. A espessura média dos pré-molares foi de 3,1mm, enquanto que nos incisivos foi de 1,8mm, a qual foi significativamente menor. Segundo os autores, as intensas reações observadas nos incisivos inferiores é devido à pequena espessura de esmalte e dentina encontrada nesses dentes, a qual permite uma maior penetração de componentes tóxicos dos agentes clareadores, causando um dano pulpar significativo.

3.3.4 Respostas moleculares de células pulpares ao H₂O₂

Atualmente os pesquisadores buscam entender os mecanismos moleculares que ocorrem no complexo dentino-pulpar frente à agressão com H₂O₂. Anderson et al.⁴ (1999), avaliaram a indução do estresse oxidativo no tecido pulpar clareado com PC a 10%, por meio da análise da expressão da enzima heme oxigenase-1 (HO-1) por imuno-histoquímica. Esta enzima é induzida em condições de estresse oxidativo, apresentando a função de proteção celular. Foi realizada aplicação de um gel clareador com 10% de PC (Opalescence[®], Ultradent) em pré-molares pelo período de 6 horas (n=17). Como controle, foi utilizado gel placebo sem o PC na sua composição (n=10). Após o período de clareamento, os dentes foram imediatamente extraídos, sendo realizada coloração para imuno-histoquímica, utilizando-se um anticorpo policlonal para OH-1. Dos 17 dentes clareados, 14 apresentaram-se positivamente corados para OH-1. As células mais intensamente coradas foram os odontoblastos adjacentes à superfície clareada e, em alguns casos, células endoteliais da polpa coronária, no entanto em menor intensidade. Segundo os autores, este resultado pode ser devido ao fato dos odontoblastos serem as primeiras células a serem atingidas pelo H₂O₂ capaz de penetrar no tecido pulpar. Desta forma, ficou demonstrado que os odontoblastos respondem a nível molecular ao estresse oxidativo causado pelo H₂O₂ proveniente de géis clareadores.

Com o objetivo de comparar o efeito do estresse oxidativo em diferentes linhagens celulares, Lee et al.⁵¹ (2006) avaliaram as respostas biológicas de uma linhagem celular odontoblastóide (MDPC-23) e pré-osteoblástica (MC3T3-E1) frente à exposição ao H₂O₂. As células foram tratadas com diferentes concentrações de H₂O₂ por períodos distintos. Inicialmente, foi realizada análise da formação de EROs intracelular, por meio de citometria de fluxo utilizando-se a sonda fluorescente DCFH-DA, a

qual apresenta a capacidade de fluorescer ao se ligar com radicais livres. As células foram incubadas com essa sonda e em seguida tratadas com H_2O_2 nas diferentes concentrações, pelo período de 3 horas. Paralelamente, foi avaliada a viabilidade celular pelo teste do MTT após incubação das células com o H_2O_2 por 1, 4 ou 15 dias. Além disso, foi avaliada a indução de diferenciação celular através da análise da produção de fosfatase alcalina (ALP) por teste colorimétrico, e da formação de nódulos de mineralização na presença de ácido ascórbico e β -glicerofosfato pela coloração Alizarin red S. Foi observada redução da viabilidade celular e aumento da produção de EROs intracelular após exposição a 0,5 e 0,3 mmol/L H_2O_2 , respectivamente, para as duas linhagens estudadas. Entretanto, a produção dos marcadores de mineralização diferiu entre as duas linhagens em estudo. Para a MDPC-23 houve uma indução significativa da expressão de ALP após 4 horas, nas concentrações de 0,2 e 0,3 mmol/L de H_2O_2 , bem como aumento na formação de nódulos de mineralização após 14 dias. Já a linhagem MC3T3-E1 apresentou inibição da expressão da ALP dose-dependente, com efeito máximo com 0,3 mmol/L, bem como leve redução da mineralização da matriz extracelular. Esses resultados demonstram que a indução do estresse oxidativo pelo H_2O_2 apresenta efeitos diferentes de acordo com o tipo celular em estudo, havendo indução da diferenciação de células odontoblastóides, e de forma contrária, inibição da diferenciação em células pré-osteoblásticas.

Com o objetivo de avaliar a indução da diferenciação de odontoblastos na presença do H_2O_2 , Min et al.⁵⁷, em 2008, estudou a expressão de marcadores de diferenciação, bem como a relação desta diferenciação com a indução do estresse oxidativo. Foi realizada cultura primária de células pulpares humanas, as quais foram expostas à diferentes concentrações de H_2O_2 , sendo realizada análise da viabilidade celular (teste do MTT). A análise da expressão dos marcadores de diferenciação de odontoblastos (DSPP, ON, BSP, DMP-1, MEPE) e do

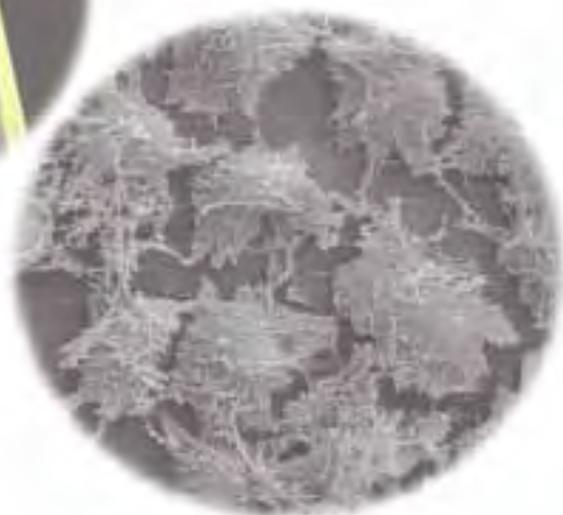
estresse oxidativo (OH-1), foram realizadas por PCR semi-quantitativo e Western Blot. Foi observado que o H_2O_2 reduziu significativamente a viabilidade celular e induziu a expressão de OH-1. Os marcadores de diferenciação supra-regulados após exposição ao H_2O_2 foram a DSPP e a DMP-1. A DSPP e a OH-1 apresentaram expressão máxima após 24 horas de exposição a 0,2 mmol/L de H_2O_2 . O pré-tratamento com inibidor de OH-1 bloqueou a expressão desta proteína e da DSPP. Isto demonstra que a expressão de DSPP após exposição ao H_2O_2 ocorre via mecanismo dependente da OH-1, sugerindo que esta proteína pode participar num mecanismo de proteção frente ao H_2O_2 em células pulpares humanas.

Caviedes-Bucheli et al.¹³ (2008) avaliaram o efeito de diferentes protocolos de clareamento na expressão de substância P (SP) no tecido pulpar humano. A SP é um neuropeptídeo que apresenta a função primária de induzir vasodilatação e aumento do fluxo sanguíneo, permitindo a chegada de células inflamatórias e liberação de mediadores da inflamação, estando relacionada com a transmissão da sensação dolorosa ao sistema nervoso central. Quarenta pré-molares foram distribuídos em quatro grupos: G1 – controle (sem tratamento); G2 – aplicação de gel clareador a 38% de H_2O_2 (Opalescence Xtra Boost[®], Ultradent) por 15 minutos; G3 – aplicação de gel clareador com 35% de H_2O_2 (Lase Peroxide[®], DMC) por 3 minutos ativado por laser infravermelho; G4 – aplicação de gel clareador com 20% de H_2O_2 (Zomm! Whitening System[®], Discus Dental) ativado por luz. Imediatamente após o procedimento clareador, os dentes foram extraídos e a polpa coronária foi removida. A extração dos neuropeptídeos foi realizada com ácido acético em banho maria a 30° C. A expressão da SP foi avaliada por meio de um isótopo radioativo I^{125} , o qual apresenta a capacidade de se ligar com a SP. Os resultados demonstraram que a SP foi expressa em todas as amostras, sendo que os grupos clareados e ativados por luz ou laser apresentaram aumento significativo da SP quando comparados com o controle. O grupo apenas clareado não apresentou diferença significativa

com o grupo controle. Segundo os autores, o clareamento associado com a utilização de luz ou calor aumenta os riscos de danos ao tecido pulpar bem como de sensibilidade dental pós-clareamento.

No estudo realizado por Matsui et al.⁵⁵, em 2009, foram avaliados os efeitos estimulatórios de baixas concentrações de H₂O₂ na calcificação de células pulpares humanas. Cultura primária de células de tecido pulpar humano foram expostas a meio de cultura contendo 100 µmol/L de H₂O₂ por 5 ou 10 minutos. Para avaliar a formação de nódulos de calcificação, após os períodos de exposição ao H₂O₂, as células foram cultivadas em meio de cultura suplementado com ácido ascórbico e β-glicerofosfato, pelo período de 28 dias. Em seguida, os nódulos foram submetidos à coloração Alizarin red S, para avaliação da produção de cálcio, e Von Kossa, para avaliação da produção de fosfato. Foi avaliada a expressão de mRNA e formação da proteína OCN (osteocalcina) e OPN (osteopontina), por meio de PCR tempo real e teste de Elisa. Além disso, os autores investigaram a formação do radical livre OH⁻ no meio de cultura contendo H₂O₂ após 5 ou 10 minutos, por meio de ressonância de spin eletrônico. Foi observada formação de pequenas quantidades de OH⁻ de acordo com o tempo de incubação com o peróxido (5 ou 10 minutos). O número de nódulos calcificados após 5 e 10 minutos de contato das células com o H₂O₂ foi significativamente maior que no controle, sugerindo que a geração de EROs como resultado do tratamento com H₂O₂ promoveu a formação de fosfato de cálcio nas células pulpares humanas. Houve um aumento significativo na produção do mRNA e do total de proteínas para OCN e OPN nas células tratadas com H₂O₂ por 10 minutos. Segundo os autores, o H₂O₂ induziu as células pulpares a se diferenciarem em células com habilidade de formar dentina.

Material e Método



4 Material e Método

4.1 Avaliação da citotoxicidade trans-amelodentinária

4.1.1 Obtenção de discos de esmalte/dentina

Cento e cinco incisivos bovinos, recentemente extraídos e provenientes de animais jovens e pertencentes à mesma faixa etária (20 a 30 meses), foram selecionados para este estudo. Foram excluídos dentes com trincas no esmalte, hipoplasia, cálculo no terço médio, alterações morfológicas ou cárie. Após remoção mecânica de restos periodontais e outros resíduos da superfície dos dentes, foram realizadas delimitações na superfície média vestibular do esmalte por meio de marcações definidas com auxílio de anel de silicone (Rodimar rolamentos Ltda. – Araraquara, SP, Brasil), para obtenção de blocos de esmalte/dentina. Os blocos com dimensões de 6,0 x 6,0 mm foram obtidos manualmente, utilizando-se para isto disco diamantado dupla face (KG Sorensen, Barueri, SP, Brasil) montado em peça reta (Dabi Atlante, Ribeirão Preto, SP, Brasil) sob refrigeração constante, seguindo as marcações pré-determinadas (Figura 1).



FIGURA 1 - Bloco de esmalte/dentina obtido a partir do terço médio da face vestibular da coroa de incisivos bovinos.

Em seguida, os espécimes foram arredondados com auxílio de ponta diamantada cilíndrica (nº 1095 KG Sorensen, Barueri, SP, Brasil), em motor de alta rotação (Dabi Atlante, Ribeirão Preto, SP, Brasil) até a obtenção de discos com 5,2 mm de diâmetro. A superfície dentinária foi regularizada por meio de desgastes com lixas d'água de granulação 400 e 600 (T469-SF- Noton, Saint-Gobam Abrasivos Ltda., Jundiaí, SP, Brasil) com movimentos giratórios manuais para cada granulação. Os discos envolvendo esmalte e dentina foram submetidos a medições de espessura por meio de um paquímetro digital (Modelo 500-144B, Mitutoyo Sul América Ltda., SP, Brasil), sendo realizada a padronização da espessura de 3,5 mm (Figura 2).



FIGURA 2 - Dimensões dos discos de esmalte/dentina obtidos a partir de incisivos bovinos.

Em seguida, a smear-layer presente sobre a dentina foi removida através da aplicação de 10 μ L de solução de EDTA 0,5 M, pH 7,2 por 30 segundos, seguido de lavagem com água deionizada esterilizada. Este procedimento teve como objetivo a limpeza superficial da dentina, promovendo a desobstrução dos túbulos dentinários⁴¹.

4.1.2 Câmara pulpar artificial (CPA)

Para o desenvolvimento desta pesquisa, foram utilizadas câmaras pulpares artificiais (CPAs). Estes dispositivos foram desenvolvidos no Laboratório de Patologia Experimental e Biomateriais da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP. Cada CPA apresenta 2 compartimentos. O compartimento superior (4 mm de altura) apresenta uma abertura de 8 mm de diâmetro, enquanto que em sua superfície inferior ocorre uma redução do diâmetro de abertura para 6 mm. Os discos de esmalte/dentina foram posicionados no compartimento superior entre dois anéis de silicone (Rodimar rolamentos Ltda – Araraquara, SP, Brasil) com diâmetro interno de 4,47 mm e espessura de 1,78 mm,

mantendo os discos em posição. O compartimento inferior apresenta perfurações circulares com a finalidade de permitir contato direto do meio de cultura com a superfície de dentina do disco (Figura 3).

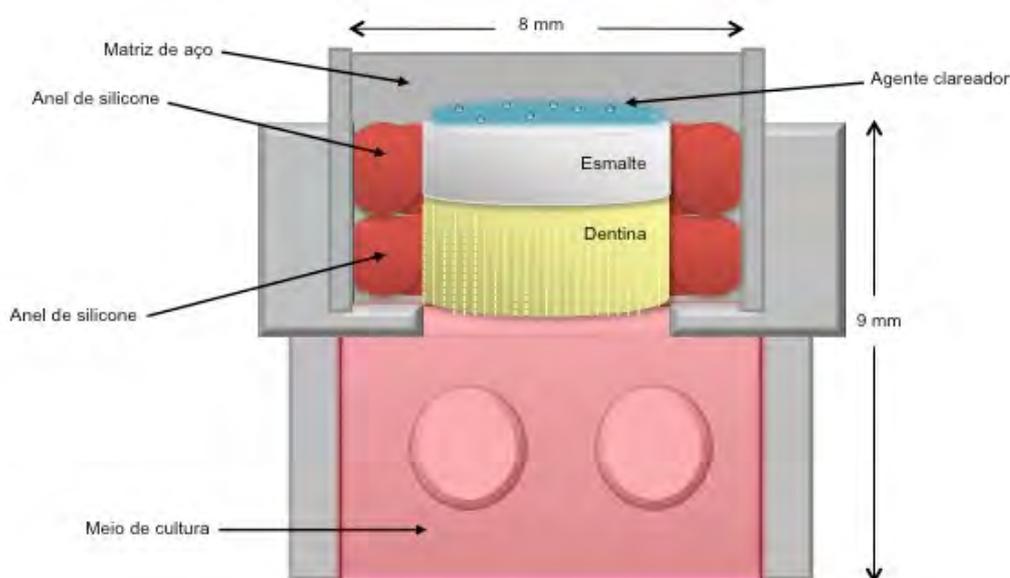


FIGURA 3 - Desenho esquemático representativo da Câmara Pulpar Artificial (CPA) com o disco de esmalte/dentina e a matriz de aço em posição (adaptado de Trindade et al.⁷⁷, 2009).

Entre o anel de silicone e a parede lateral do compartimento superior da câmara foi adaptada uma matriz de aço de 5 mm (Injecta Produtos Odontológicos, Diadema, SP, Brasil) com o objetivo de manter o gel clareador sobre o esmalte. As CPAs com os discos de esmalte/dentina em posição, foram autoclavadas individualmente em recipientes de vidro, contendo água deionizada, pelo período de 15 minutos, à 120 °C e pressão de 1 Kg/força. Após autoclavagem, foi realizado vedamento lateral com cera rosa nº 7 (Wilson[®], Polidental, Cotia, SP, Brasil), previamente esterilizada, na região entre o disco de esmalte/dentina e a

matriz de aço, em câmara de fluxo laminar vertical (Bio Protector Plus 12, Veco do Brasil – Ind. Com. de Equipamentos Ltda, Campinas, SP, Brasil) com o objetivo de evitar a difusão do gel clareador através dos anéis de silicone (Figura 4).

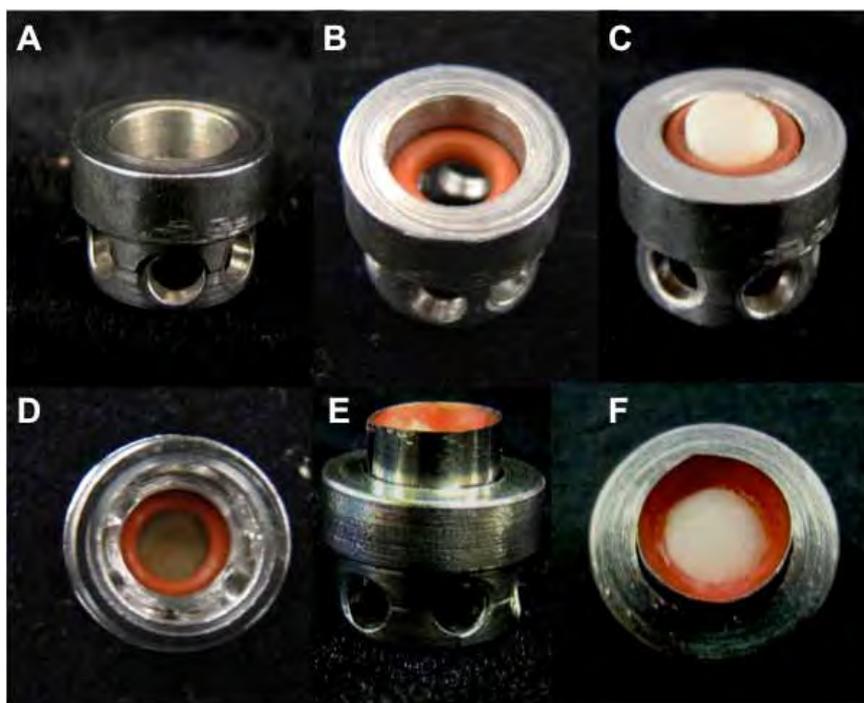


FIGURA 4 - Imagens ilustrativas da CPA. **A:** Vista lateral dos dois compartimentos; **B:** CPA com primeiro anel de silicone em posição; **C:** CPA com disco de esmalte/dentina e segundo anel de silicone em posição; **D:** Vista da superfície de dentina do disco; **E:** CPA com a matriz de aço em posição; **F:** Vedamento adicional com cera 7 na região do anel de silicone.

4.1.3 Cultivo das células MDPC-23

Células odontoblastóides da linhagem MDPC-23 foram cultivadas em garrafas plásticas esterilizadas de 75 cm² (Costar Corp., Cambridge,

MA, EUA) em meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA) contendo 10% de soro fetal bovino (SFB, Gibco, Grand Island, NY, EUA), 100 IU/mL e 100 mg/mL, respectivamente, de penicilina e estreptomicina e 2 mmol/L de glutamina (Gibco, Grand Island, NY, EUA) em uma atmosfera umedecida contendo 5% de CO₂ à temperatura de 37 °C, sendo subcultivadas a cada 3 dias na concentração de 30.000 células/cm² até a obtenção do número suficiente de células para realização do experimento.

4.1.4 Procedimento clareador

Em capela de fluxo laminar vertical (Bio Protector Plus 12 – Veco, SP, Brasil), as CPAs contendo os discos de esmalte/dentina foram posicionadas nos compartimentos das placas acrílicas esterilizadas de 24 compartimentos com a superfície de dentina voltada para o fundo do compartimento. Aproximadamente 1 mL de meio de cultura foi colocado em cada compartimento de tal maneira que a superfície de esmalte do disco permaneceu voltada para cima e totalmente exposta, permitindo a aplicação do agente clareador, e a superfície dentinária permaneceu em contato direto com o meio de cultura (Figura 5).



FIGURA 5 - CPA posicionada na placa de 24 compartimentos contendo 1mL de DMEM, e aplicação do gel clareador.

Em seguida, a superfície de esmalte foi lavada com 1 mL de água deionizada esterilizada com pipetas e concomitante sucção. As CPAs foram distribuídas em diferentes grupos de acordo com o tratamento proposto (Tabela 1).

Tabela 1 - Distribuição dos grupos experimentais para avaliação da citotoxicidade trans-amelodentinária de acordo com o tratamento proposto

Grupos	n	Tratamento
G1	15	Água deionizada (controle negativo)
G2	15	Saliva artificial (controle)
G3	15	1 aplicação do PC a 10%
G4	15	7 aplicações do PC a 10%
G5	15	14 aplicações do PC a 10%
G6	15	1 aplicação do PC a 16%
G7	15	7 aplicações do PC a 16%
G8	15	14 aplicações do PC a 16%

Em cada aplicação, 30 mg do gel clareador (peróxido de carbamida a 10 ou 16%, Whiteness Perfect FGM, Joinville, SC, Brasil) foi cuidadosamente dispensado sobre a superfície de esmalte, onde permaneceu por 8 horas dentro de uma incubadora com 5% de CO₂ numa temperatura de 37°C. Decorrido este período, o gel foi aspirado, a superfície de esmalte foi lavada com água deionizada e seca com bolinha de algodão esterilizada. Em seguida, 100 µL de saliva artificial (fosfato de potássio monobásico 3,9%; cloreto de cálcio 3,6%; cloreto de sódio 2%; cloreto de potássio 2%; cloreto de magnésio 3,7%; phenochem 0,2%; gel de natrosol 10%; água destilada qsp), obtida em farmácia de manipulação, foi aplicada na superfície de esmalte pelo período de 16 horas em incubadora. O grupo controle G1 teve a superfície de esmalte em contato com água deionizada durante todo o experimento (14 dias). No grupo controle G2, a superfície de esmalte ficou em contato com água deionizada pelo mesmo período em que foi aplicado o gel clareador nos grupos experimentais (8 horas), ficando o restante do tempo em contato com saliva artificial (16 horas), pelo período de 14 dias. Esses grupos passaram pelas mesmas condições dos grupos experimentais. Três experimentos independentes foram realizados em momentos distintos para demonstrar a reprodutibilidade dos resultados.

4.1.5 Avaliação do metabolismo celular (teste de MTT)

A análise da atividade metabólica celular foi realizada por meio da demonstração citoquímica da desidrogenase succínica (SDH), a qual representa a taxa de respiração mitocondrial das células. Esse método é baseado na habilidade das mitocôndrias ativas de células vivas em converter o composto tetrazolium em um produto insolúvel. A enzima desidrogenase succínica das células viáveis quebra a estrutura do sal de

tetrazolium, produzindo cristais de formazan de coloração azul. Assim, as diferentes tonalidades de azul são avaliadas em Leitor de Elisa⁵⁸.

Para cada grupo, 12 compartimentos foram utilizados para análise do metabolismo celular. Ao final da penúltima aplicação do gel, as CPAs foram transferidas para novas placas de 24 compartimentos com 1mL de meio de cultura para obtenção do extrato (meio de cultura + possíveis componentes do gel clareador difundidos na última aplicação do produto sobre o esmalte). Após a última aplicação, o gel clareador foi aspirado e a superfície de esmalte foi lavada com água deionizada (Figuras 6 e 7).

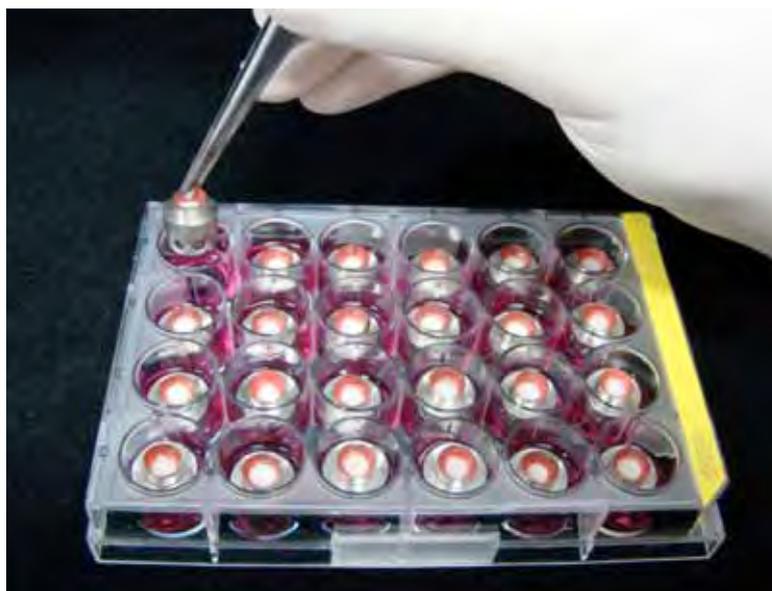


FIGURA 6 - Remoção da CPA da placa de 24 compartimentos após a penúltima aplicação do gel clareador.

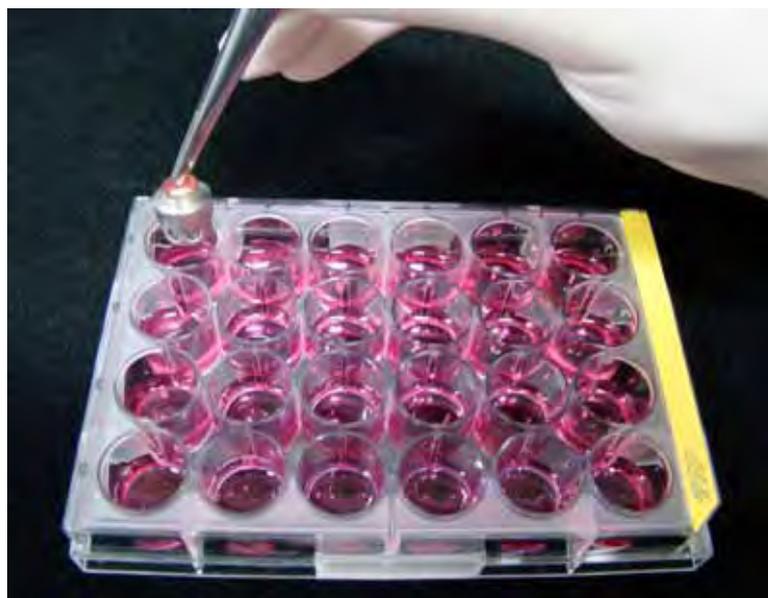


FIGURA 7 - Posicionamento da CPA em nova placa de 24 compartimentos contendo 1 mL de DMEM para realização da última aplicação do gel clareador e obtenção do extrato.

O extrato foi recolhido e o volume de 500 μ L foi aplicado sobre as células odontoblastóides MDPC-23 cultivadas previamente, permanecendo em contato com as mesmas por 60 minutos em incubadora a 37 °C e 5% de CO₂ (Figura 8).

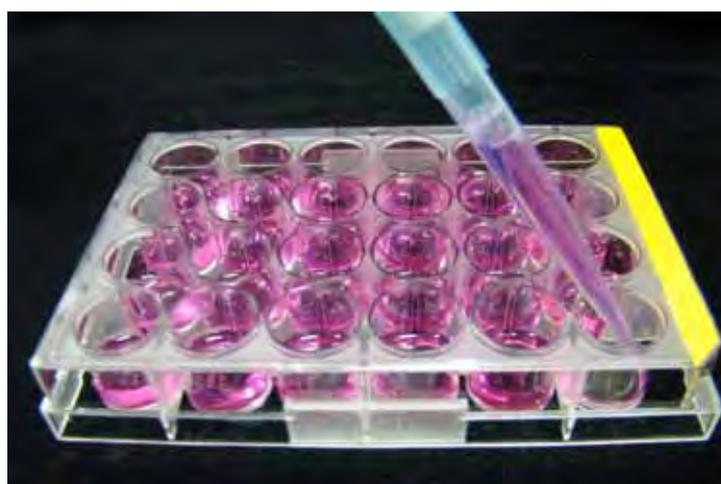


FIGURA 8 - Aplicação do extrato nas células MDPC-23 previamente cultivadas em placas de 24 compartimentos.

Em seguida, o extrato foi aspirado e uma solução contendo 900 μL de meio de cultura DMEM e 100 μL de solução de MTT (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA) na concentração de 5 mg/mL de PBS, foi aplicada em cada compartimento com a finalidade de identificar as células viáveis pela clivagem dos anéis de tetrazolium. As células imersas nesta solução foram incubadas por mais 4 horas a 37 °C. Em seguida, o meio de cultura com a solução de MTT foi aspirado e cada compartimento recebeu 600 μL de solução de isopropanol acidificado em HCl a 0,04 N para solubilizar os cristais formados pela degradação dos anéis de tetrazolium. A coloração produzida foi quantificada, considerando-se que as células com atividade mitocondrial normal são coradas em azul intenso.

A viabilidade celular foi avaliada de maneira proporcional à absorbância determinada a 570 nm em leitor de ELISA (TP - Reader, ThermoPlate, China). Para tal finalidade, três alíquotas de 100 μL de cada compartimento foram removidas e colocadas em outra placa com 96 compartimentos (Costar Corp., Cambridge, MA, EUA). Para a padronização da leitura, os três primeiros compartimentos da placa foram preenchidos com 100 μL da solução de isopropanol acidificado em HCL a 0,04 N para se determinar o valor correspondente à passagem total da luz (branco), ou seja, ao valor máximo para a redução do metabolismo celular (0% de metabolismo). Por outro lado, para o grupo controle (G1) onde não foi aplicado gel clareador, representando as células em condições normais, considera-se 100% de metabolismo. Os resultados foram obtidos por meio da média em valores numéricos das alíquotas de cada compartimento. Em seguida, foi calculado, em porcentagem, o efeito inibitório dos diferentes grupos estudados sobre a atividade mitocondrial das células. O experimento foi realizado em três momentos distintos para demonstrar a reprodutibilidade dos resultados.

4.1.6 Análise da morfologia celular

Três compartimentos representativos dos grupos experimentais e controle foram destinados à avaliação da morfologia das células, utilizando-se, para isto, um microscópio eletrônico de varredura. Lamínulas de vidro com 13 mm de diâmetro, previamente esterilizadas, foram posicionadas no fundo dos compartimentos imediatamente antes do cultivo das células. Após o período de incubação das células em contato com os extratos, estes foram aspirados e as células MDPC-23 que permanecerem aderidas às lamínulas de vidro foram, então, fixadas por uma hora em 1 mL de glutaraldeído tamponado a 2,5%. Posteriormente à fixação inicial das células, estas foram submetidas aos seguintes procedimentos:

1. Lavadas por três vezes com 1 mL de PBS (5 minutos cada lavagem).
2. Pós-fixadas em 200 μ L de tetróxido de ósmio a 1% por 60 minutos.
3. Lavadas por duas vezes em 1 mL de PBS (5 minutos cada lavagem).
4. Lavadas por duas vezes em 1 mL de água destilada (15 minutos cada lavagem).
5. Desidratadas em 1mL de solução de etanol 30%, 50% e 70%, 2x 95% e 2x 100% (30 minutos em cada solução).
6. Lavadas por três vezes com 200 μ L de 1,1,1,3,3,3,-Hexamethyldisilazane, 98% (HMDS, ACROS Organics, New Jersey, NY, USA), 20 minutos cada lavagem.

Finalmente, a solução de HMDS foi desprezada, as lamínulas

contendo as amostras foram removidas do fundo dos compartimentos, fixadas em stubs metálicos e mantidas em recipientes fechados por 12 horas em dessecador. Decorrido o tempo, os stubs contendo as lamínulas fixadas foram metalizados com ouro (BAL-TEC SCD 050, Balzers, Germany) e analisados em microscópio eletrônico de varredura (JEOL-JMS-T33A Scanning Microscope, JEOL-USA Inc., Japão) para determinação da morfologia celular.

4.2 Avaliação das alterações estruturais no esmalte

4.2.1 Avaliação da microdureza

Para avaliação da microdureza, obtiveram-se vinte e quatro blocos de esmalte e dentina provenientes do terço médio de incisivos bovinos, os quais apresentaram dimensões de 6,0 mm x 6,0 mm. A seleção dos dentes bovinos seguiu os mesmos critérios estabelecidos para o teste da citotoxicidade. Os blocos de esmalte/dentina foram incluídos em resina acrílica autopolimerizável (Vipi Flash, Vipi Ltda, Pirassununga, SP) com o auxílio de matrizes circulares provenientes de cano de PVC. A superfície de esmalte foi regularizada com lixas d'água com granulações seqüenciais (320, 600, 1200 e 1500), em politriz pelo período de 30 segundos cada. Em seguida foi realizado polimento do esmalte exposto com uma seqüência de pastas diamantadas com granulações de 6, 3 e 1 μm (Arotec, Arotec S.A., Cotia, SP). Os espécimes foram divididos em três grupos de acordo com o tratamento proposto, como pode ser observado na Tabela 2.

Tabela 2 - Distribuição dos espécimes para avaliação da microdureza do esmalte de acordo com o tratamento proposto

Grupos	n	Tratamento
GI	8	Controle negativo
GII	8	Peróxido de carbamida a 10%
GIII	8	Peróxido de carbamida a 16%

Os discos de resina contendo os espécimes foram posicionados em placas acrílicas de 6 compartimentos, sendo realizada aplicação do gel clareador (Figura 9).



FIGURA 9 - Blocos de esmalte incluídos em resina acrílica e posicionados na placa de 6 compartimentos para realização do procedimento clareador.

Nos grupos GII e GIII, o gel clareador foi aplicado na superfície do esmalte pelo período de 8 horas em estufa a 37°C. Decorrido este período, o gel foi removido com auxílio de bolinhas de algodão, seguido de lavagem com 5 mL de água deionizada. A água foi aspirada com pipeta Pasteur e 5 mL de saliva artificial foi aplicada em cada compartimento, a qual permaneceu em contato com os espécimes pelo

período de 16 horas. Este procedimento foi realizado por 14 dias consecutivos.

Foi realizada mensuração da microdureza Knoop, utilizando-se carga de 50g por 15 segundos. Foram realizadas cinco edentações em cada espécime nos seguintes períodos: antes do procedimento clareador (dia 0) e nos períodos de 1, 7 e 14 dias pós-clareamento. As edentações foram realizadas em uma área $1,0 \text{ mm}^2$ em região padronizada no espécime. Cada edentação estava distante $0,1 \text{ mm}$ horizontalmente e $0,5 \text{ mm}$ mm verticalmente da edentação seguinte (Figura 10).

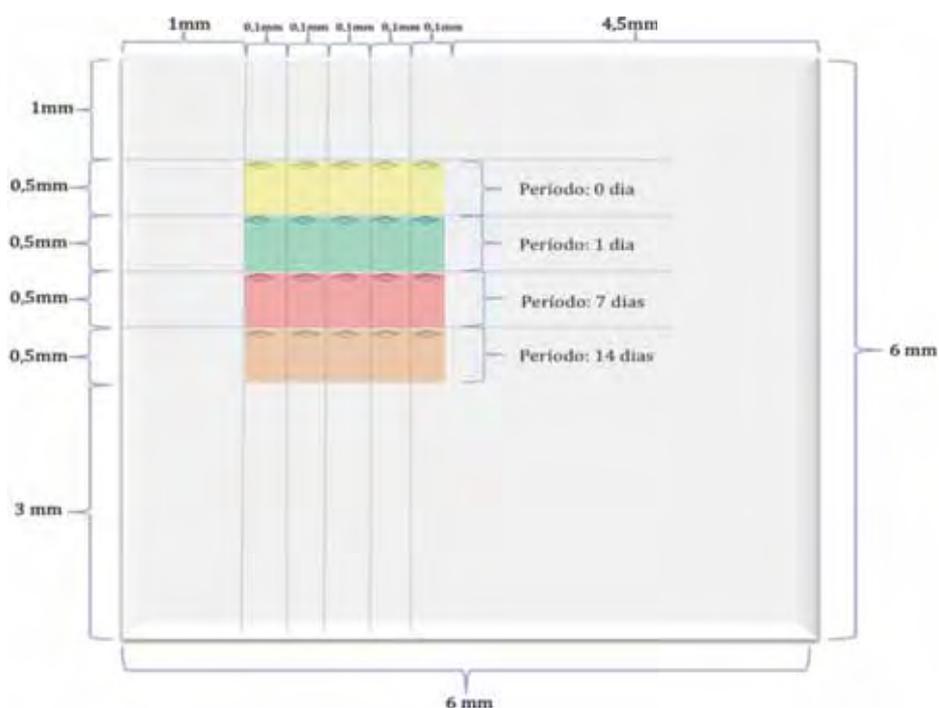


FIGURA 10 - Desenho esquemático representativo da área do espécime onde foram realizadas as edentações.

4.2.2 Avaliação da morfologia superficial

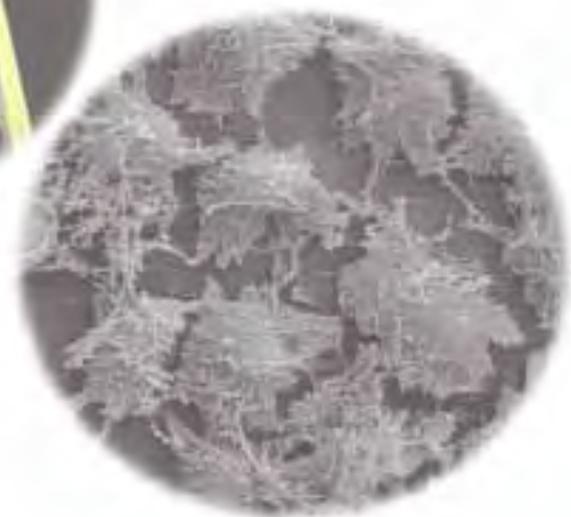
Dois espécimes representativos de cada grupo experimental foram selecionados para análise da morfologia superficial do esmalte em microscópio eletrônico de varredura (Philips FEG XL 30, Oxford, United States). Esta análise foi realizada nos mesmos espécimes submetidos ao teste da microdureza após 14 dias de clareamento. Os espécimes foram desidratados em 1mL de soluções de crescentes de etanol (30%, 50% e 70%, 2x 95% e 2x 100%) permanecendo por 30 minutos em cada solução, e em seguida foram mantidos por 30 dias em dessecador à vácuo para secagem. Após esses procedimentos, foi realizada fixação dos espécimes em stubs metálicos e metalização por ouro, sendo realizada a avaliação por MEV.

4.3 Tratamento estatístico dos resultados

Os dados das variáveis dependentes do estudo (MTT e microdureza Knoop) foram avaliados quando a sua distribuição (Kolmogorov-Smirnov) e homocedasticidade (Levene). Como as variáveis apresentaram aderência à curva normal e homogeneidade de variâncias, foram aplicados testes paramétricos.

Para a variável MTT, a comparação entre os grupos foi realizada pelo teste ANOVA a um critério fixo, enquanto que para a variável microdureza, foi utilizado o teste ANOVA a dois critérios fixos com uma medida repetida (frequência de aplicação). Uma vez rejeitada a hipótese nula de igualdade entre os grupos, foram aplicados testes de Tukey para comparação aos pares. Todos os testes estatísticos foram considerados ao nível pré-estabelecido de significância de 5%. A análise da morfologia celular e da morfologia superficial do esmalte foram realizadas de forma descritiva.

Resultado



5 Resultado

5.1 Citotoxicidade trans-amelodentinária

5.1.1 Metabolismo celular (Teste de MTT)

Não foi observado diferença estatisticamente significativa entre os grupos controles G1 e G2, bem como entre esses grupos e os grupos experimentais G3, G4 e G5, onde foi aplicado PC a 10% ($p > 0,05$). A redução do metabolismo celular para os períodos de 1, 7 e 14 dias foi de 12,47%; 6,38%; e 5,81%, respectivamente, considerando que o grupo controle representava 100% de metabolismo celular. Ao se comparar estes grupos experimentais com PC a 10% entre si (G3, G4 e G5), não foi observada diferença estatisticamente significativa entre eles quando o gel foi aplicado pelos períodos de 1, 7 ou 14 dias ($p > 0,05$).

Todos os grupos que receberam a aplicação de PC a 16% (G6, G7 e G8) apresentaram redução estatisticamente significativa do metabolismo celular quando comparados aos controles G1 e G2 ($p < 0,05$). A redução do metabolismo foi de 40,32%; 30,16%; e 26,61% para os períodos de 1, 7 e 14 dias, respectivamente. Ao se comparar estes grupos experimentais entre si (G6, G7 e G8), não foi observada diferença estatisticamente significativa entre eles quando o gel foi aplicado pelos períodos de 1, 7 ou 14 dias ($p > 0,05$).

De maneira geral, foi evidente que o clareamento realizado através do uso de PC a 16% causou, nos períodos de 1 e 7 dias, uma redução estatisticamente maior no metabolismo das células MDPC-23, do que aquela determinada para o PC a 10% ($p < 0,05$). Apenas no período de 14 dias, não foi observado diferença estatística para os tratamentos com 10% (G5) e 16% (G8) de PC quanto ao metabolismo das células em cultura ($p > 0,05$).

Os resultados de metabolismo celular (Teste de MTT) estão representados na Figura 11.

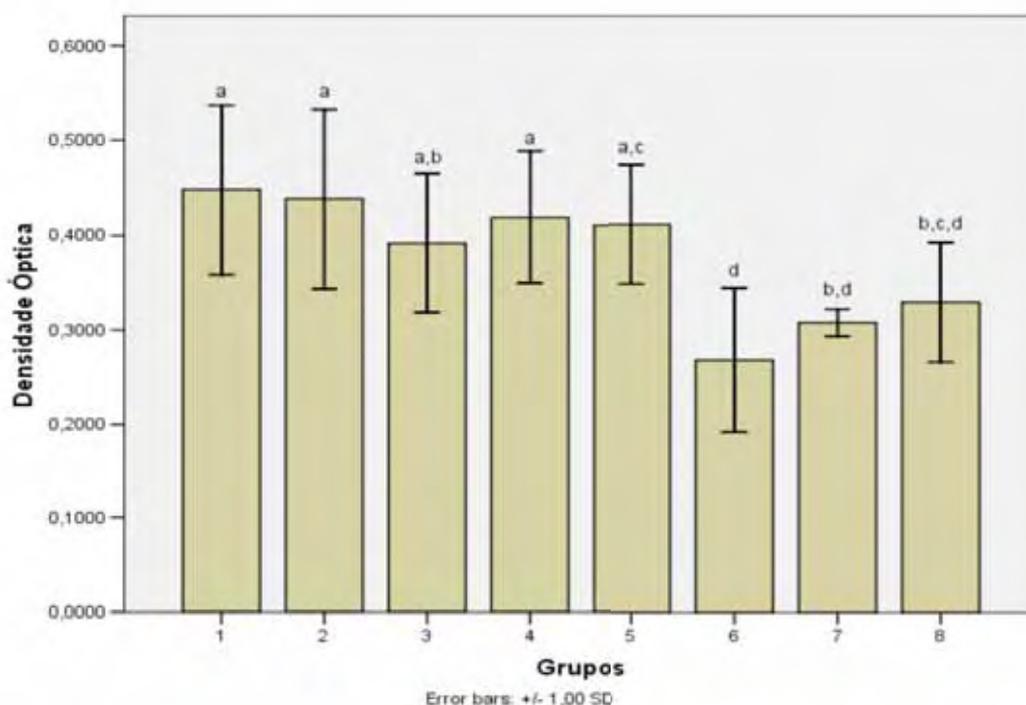


FIGURA 11 - Representação gráfica dos valores do metabolismo celular (MTT). Barras representam médias (n=12) e desvio padrão. Letras iguais indicam ausência de diferença estatística entre os grupos (Teste de Tukey, $p > 0,05$).

5.1.2 Análise da morfologia celular em microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Nos grupos controle água deionizada e saliva artificial (G1 e G2), observou-se que um grande número de células odontoblastóides MDPC-23 permaneceram aderidas ao substrato de vidro. As células estavam próximas da confluência, recobrando, através de seu amplo citoplasma, toda a superfície do substrato. A morfologia celular apresentou-se dentro do normal com numerosos prolongamentos citoplasmáticos originados de

sua membrana (Figura 12A/B/C/D). Nos grupos onde foi aplicado PC a 10% (G3, G4 e G5), observou-se a manutenção do grande número de células odontoblastóides MDPC-23 aderidas ao substrato de vidro. Porém, estas células apresentavam discreta alteração morfológica, caracterizada, particularmente, por contração de seu citoesqueleto, o que resultou na redução de tamanho de cada célula individualmente. O resultado desta redução no tamanho celular foi a exposição de pequenas áreas do substrato de vidro (Figura 13A/B/C/D/E/F). Já nos grupos onde os extratos foram obtidos após tratamento do esmalte com PC a 16%, observou-se significativa redução do número de células que permaneceram aderidas à lamínula de vidro. Assim, amplas áreas de substrato de vidro foram expostas, onde foi possível observar restos de estruturas de células mortas, as quais se deslocaram da lamínula e assim se perderam com a delicada lavagem realizada dos espécimes. Estas características determinadas através da análise da morfologia e organização das células sobre o substrato de vidro indicam a ocorrência de lesão e morte celular devido ao procedimento clareador utilizando gel de PC a 16%. As poucas células odontoblastóides observadas sobre o substrato apresentam morfologia variada, sendo que longos prolongamentos citoplasmáticos originados de sua membrana parecem participar diretamente da adesão destas células à lamínula de vidro (Figura 14A/B/C/D/E/F).

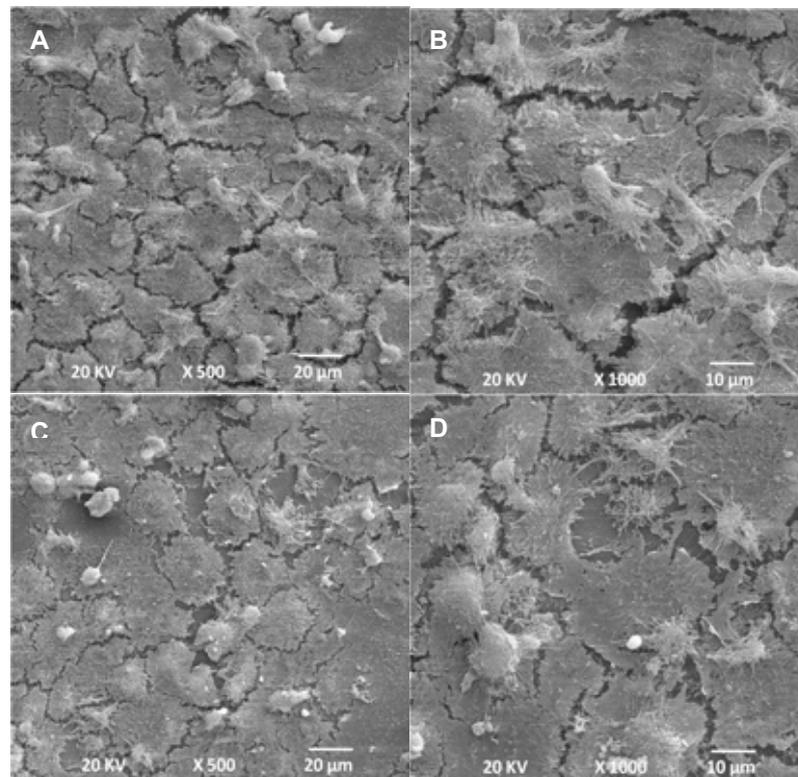


FIGURA 12 - Fotomicrografias representativas dos grupos controles. **A/B**: Grupo controle água deionizada (G1) – **A**: Um grande número de células MDPC-23 em confluência pode ser observado sobre o substrato de vidro. MEV, aumento original X 500. **B**: Estas células exibem amplo citoplasma, o que faz com que elas recubram toda lamínula de vidro sobre a qual foram cultivadas. Note os numerosos prolongamentos citoplasmáticos originados de sua membrana. MEV, aumento original X 1000. **C/D**: Grupo controle saliva artificial (G2) - **C**: Tal como observado para o grupo G1, um grande número de células MDPC-23 permaneceu aderido ao substrato de vidro. MEV, aumento original X 500. **D**: As células odontoblastóides apresentam características histológicas de normalidade. MEV, aumento original X 1000.

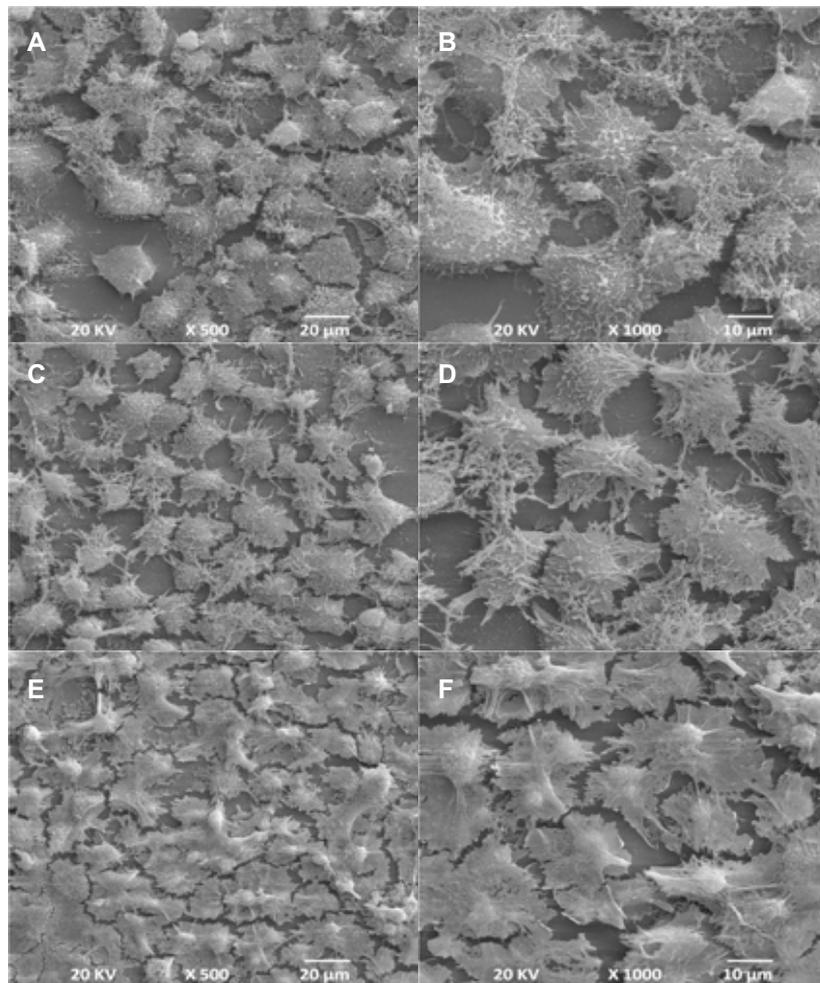


FIGURA 13 - Fotomicrografias representativas dos grupos experimentais submetidos ao clareamento com PC a 10%. **A/B:** PC a 10% por 1 dia (G3) – **A:** Pode-se observar um grande número de células aderidas ao substrato de vidro. MEV, aumento original X 500. **B:** As células MDPC-23 apresentam uma leve redução no seu tamanho, expondo discretas áreas do substrato de vidro. MEV, aumento original X 1000. **C/D:** PC a 10% por 7 dias (G4) – **C:** Novamente observa-se que as células que permaneceram aderidas ao substrato de vidro, apresentam contração do citoplasma. MEV, aumento original X 500. **D:** Detalhe da figura anterior (13C), com as células de tamanho rediuizado apresentando numerosos prolongamentos citoplasmáticos originados de sua membrana. MEV, aumento original X 1000. **E/F:** PC a 10% por 14 dias (G5) - **E:** Observa-se manutenção de um grande número de células aderidas ao substrato de vidro. MEV, aumento original X 500. **F:** Note que as células contraídas exibem um citoplasma ligeiramente mais amplo do que aquele observado para os grupos G3 e G4. MEV, aumento original X 1000.

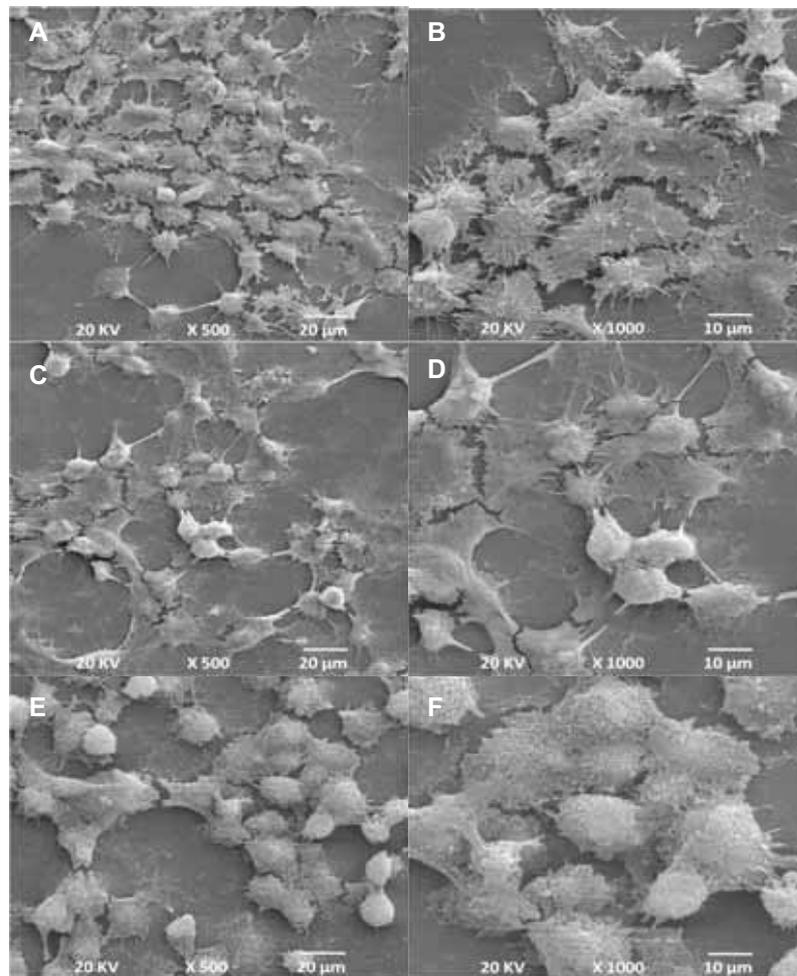


FIGURA 14 - Fotomicrografias representativas dos grupos experimentais submetidos ao clareamento com PC a 16%. **A/B**: PC a 16% 1 dia (G6) - **A**: Pode-se observar uma redução do número de células aderidas ao substrato de vidro. Note que resíduos de membrana citoplasmática das células que foram letalmente agredidas podem ser observados sobre o substrato. MEV, aumento original X 500. **B**: Detalhe da figura anterior, onde pode-se observar que as poucas células apresentam variados tamanhos. MEV, aumento original X 1000. **C/D**: PC a 16% 7 dias (G7) - **C**: Note as poucas células com longos prolongamentos citoplasmáticos. MEV, aumento original X 500. **D**: Detalhe das células de variada morfologia que permaneceram aderidas ao substrato de vidro. MEV, aumento original X 1000. **E/F**: PC a 16% 14 dias (G8) – **E**: A grande maioria das células observadas sobre o substrato apresenta morfologia arredondada. Porém, amplas áreas de perda celular ainda são vistas. MEV, aumento original X 500. **F**: Detalhe de um grupo de células odontoblastóides MDPC-23 com citoplasma contraído, porém com finas estruturas, características de formação de prolongamentos citoplasmáticos, originados de sua membrana. MEV, aumento original X 1000.

5.2 Alterações estruturais no esmalte

5.2.1 Avaliação da microdureza do esmalte

Os valores obtidos de dureza (Knoop) superficial do esmalte dentário em função da concentração de peróxido de carbamida e da frequência de sua aplicação estão apresentados na Tabela 3. Não foi observada diferença significativa entre os valores da microdureza inicial entre os espécimes dos grupos controle e experimentais (Tukey, $p>0,05$). Ambas as variáveis do estudo, concentração de PC e frequência de aplicação, exerceram efeito significativo sobre a dureza superficial do esmalte (Tukey, $p<0,05$). O efeito da interação dessas variáveis também foi estatisticamente significativo (ANOVA, $p<0,05$).

Tabela 3 - Valores da dureza Knoop do esmalte dos grupos controle e experimentais de acordo com o período de aplicação. Letras maiúsculas referem-se às colunas e letras minúsculas às linhas

Grupos	Períodos de aplicação (dias)			
	0	1	7	14
GI	284,9 (14,7)* A,a**	284,6 (15,1) A,a	286,8 (15,2) A,a	285,0 (16,7) A,a
GII	300,9 (11,4) A,a	286,3 (9,1) A,a	257,1 (22,9) B,b	262,4 (14,8) B,b
GIII	285,5 (27,0) A,a	254,3 (14,6) B,b	239,6 (18,2) B,b	228,3 (16,3) C,b

*Valores representam média (desvio-padrão) de dureza Knoop, $n=8$.

** Médias seguidas por letras maiúsculas iguais nas colunas e minúsculas nas linhas não diferem estatisticamente (Tukey, $p>0,05$)

Pôde-se observar que no grupo controle (GI) a dureza do esmalte permaneceu inalterada durante todo o período experimental. Quando PC a 10% foi utilizado, redução significativa da dureza superficial do esmalte foi observada após 7 e 14 aplicações em relação a dureza inicial (Tukey, $p < 0,05$), não sendo observada diferença estatisticamente significativa entre esses dois períodos (Tukey, $p > 0,05$). Para o grupo clareado com PC a 16%, observou-se redução significativa da dureza do esmalte em comparação ao controle, após 1, 7 e 14 dias de aplicação (Tukey, $p < 0,05$). Entretanto, não foi observada diferença estatística entre os períodos de 1 e 7 dias (Tukey, $p > 0,05$).

5.2.2 Avaliação da Morfologia Superficial do Esmalte

No grupo controle (GI), pôde-se observar que a superfície do esmalte apresentou-se regular com presença de pequena quantidade de poros e fissuras (Figura 15).

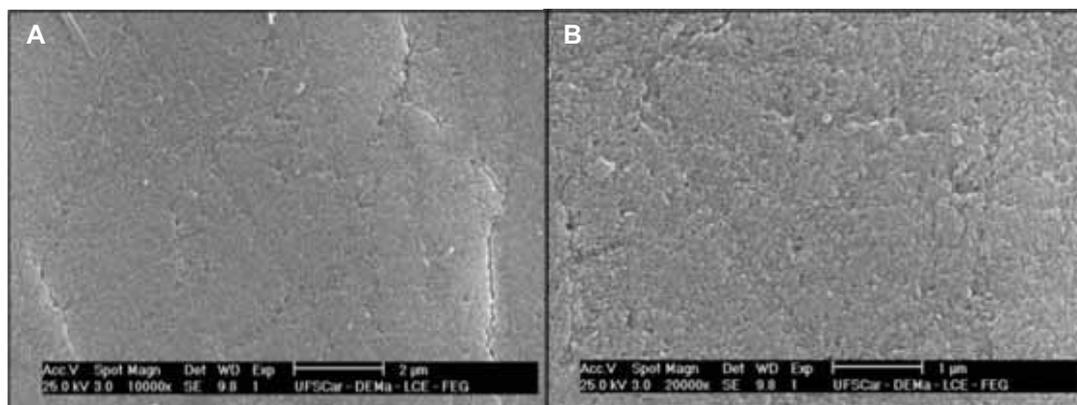


FIGURA 15 - Característica da morfologia superficial do esmalte do grupo controle (GI). O esmalte apresenta-se regular com uma pequena quantidade de poros (A – MEV, aumento original X 10.000; B – MEV, aumento original X 20.000).

Para o grupo clareado com PC a 10% (GII), a morfologia superficial do esmalte apresentou-se regular, não sendo observadas diferenças consideráveis em relação às amostras do grupo controle (Figura 16).

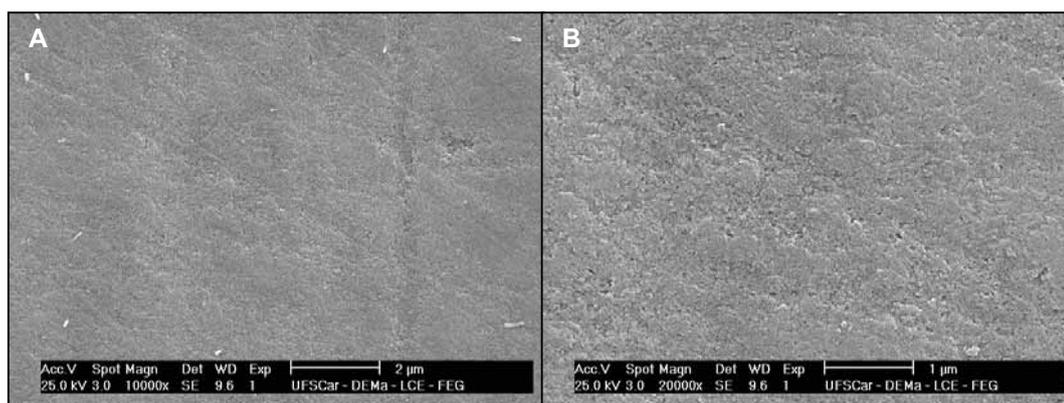


FIGURA 16 - Característica da morfologia superficial do esmalte do grupo clareado com PC a 10% (GII). O esmalte apresenta morfologia semelhante ao grupo controle GI (A – MEV, aumento original X 10.000; B – MEV, aumento original X 20.000).

No grupo clareado com PC a 16% (GIII), a micromorfologia superficial do esmalte apresentou-se mais irregular quando comparado ao grupo controle. Pode-se observar ainda uma maior quantidade de poros superficiais e fissuras mais pronunciadas, no entanto essas alterações foram consideradas sutis.

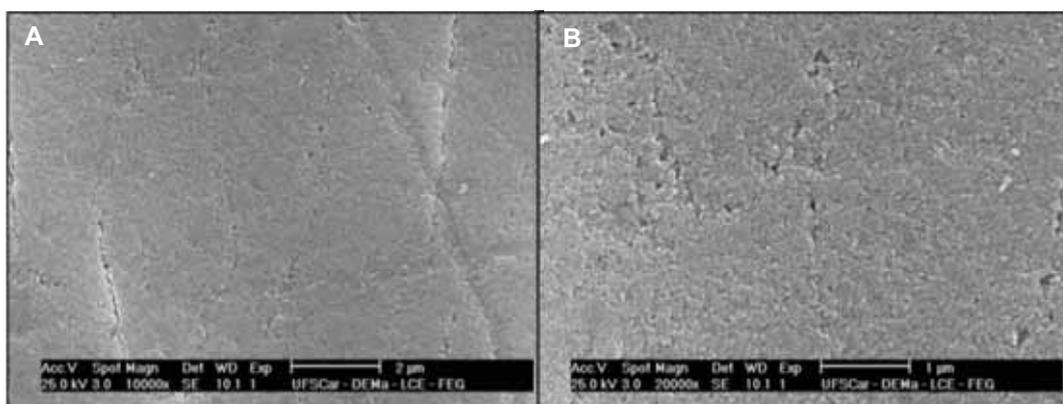
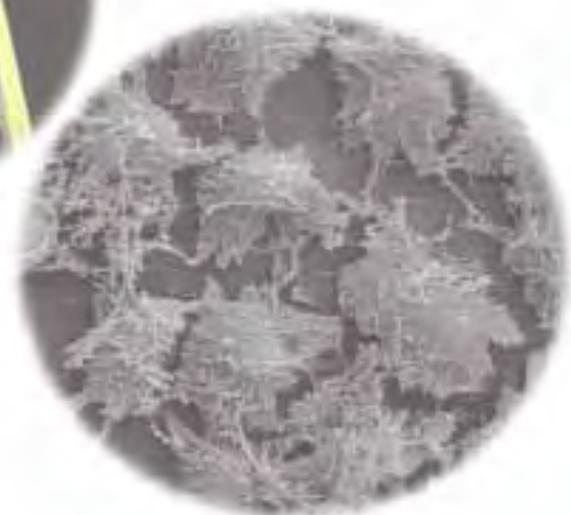


FIGURA 17 - Característica da morfologia superficial do esmalte do grupo clareado com PC a 16% (GIII). Pode-se observar alteração sutil da superfície de esmalte. Nota-se que a superfície do esmalte apresentou-se porosa e as fissuras tornaram-se mais pronunciadas (A – MEV, aumento original X 10.000; B – MEV, aumento original X 20.000).

Discussão



6 *Discussão*

Atualmente, a busca por um sorriso esteticamente perfeito tem levado muitos pacientes e dentistas a utilizarem indiscriminadamente a terapia de clareamento dental, por este ser considerado um procedimento supostamente não invasivo^{17,42,81}. No entanto, cerca de 2/3 dos pacientes submetidos ao clareamento relatam sensibilidade dental⁵⁴, o que demonstra que este procedimento clínico pode resultar em algum tipo de alteração para o complexo dentino-pulpar.

Diversos estudos têm demonstrado que a aplicação de géis clareadores na superfície de esmalte promove difusão de H₂O₂ para a câmara pulpar dentro de poucos minutos, e esta difusão é diretamente proporcional à concentração do agente clareador utilizado^{6,8,11,16,32,33}. Desta forma, com o objetivo principal de entender a possível relação entre a penetração de componentes dos géis clareadores nas estruturas dentais e seus efeitos tóxicos sobre células pulpares, estudos recentes avaliaram a citotoxicidade de géis clareadores com altas concentrações de H₂O₂ (20-38%). Os autores aplicaram o gel sobre discos de esmalte e dentina e observaram que componentes do agente clareador foram capazes de atravessar a estrutura dentária e causar intensos efeitos tóxicos sobre as células pulpares em cultura, caracterizado por notável redução no metabolismo celular associado a profundas alterações na morfologia e até mesmo morte das células^{15,22,66,77}. Além destes dados científicos in vitro, foi demonstrado, recentemente, que o clareamento de consultório, realizado através da aplicação de géis clareadores com elevada concentração de H₂O₂ sobre o esmalte de dentes anteriores pode causar necrose pulpar.²⁰ Os autores descreveram que cuidados devem ser tomados quando da realização dos procedimentos clínicos de clareamento de consultório, pois componentes dos géis podem se difundir

mais facilmente quanto mais delgado for a espessura do esmalte e dentina, como é o caso dos dentes anteriores.

Agressões de tal magnitude, que causam morte de odontoblastos, os quais são células terminais especializadas responsáveis pela manutenção da integridade do complexo dentino-pulpar, promovem um envelhecimento precoce do tecido pulpar. Isso ocorre devido à necessidade do recrutamento de células mesenquimais indiferenciadas para se diferenciarem em novos odontoblastos, reduzindo, dessa forma, a capacidade de reparação tecidual ligada ao limitado número de células na polpa remanescente²⁰. Desta forma, a técnica de clareamento caseiro parece ser uma alternativa mais adequada para minimizar tais efeitos agressivos, devido à liberação lenta e gradual de H₂O₂ a partir de géis clareadores à base de peróxido de carbamida^{32,39}.

O presente trabalho avaliou a citotoxicidade trans-amelodentinária de géis clareadores caseiros contendo 10 e 16% de peróxido de carbamida, aplicados por diferentes períodos na superfície do esmalte, sobre células de linhagem odontoblástica. Seguindo uma metodologia já descrita e estabelecida na literatura para avaliação dos efeitos citotóxicos de agentes clareadores^{15,22,66,77}, no presente estudo, foram utilizadas câmaras pulpares artificiais (CPAs), com o objetivo de simular, em laboratório, uma situação *in vivo*. Assim, discos de esmalte e dentina montados em CPAs permitiam que o gel clareador fosse aplicado sobre a superfície de esmalte e que os produtos se difundissem através da estrutura dentária, atingindo o meio de cultura em contato com a dentina. A espessura de esmalte e dentina dos discos foi de aproximadamente 3,5 mm, similar ao encontrado em incisivos humanos³⁷. Dentes bovinos foram selecionados por apresentarem características morfológicas similares aos dentes humanos, como tamanho e diâmetro dos túbulos dentinários^{29,49,69}. As células MDPC-23, utilizadas na presente pesquisa, caracterizam uma linhagem imortalizada de células odontoblásticas que possuem fenótipo semelhante ao dos odontoblastos *in vivo*, apresentando alta atividade da

fosfatase alcalina e expressão de sialoproteína e fosfoproteína dentinária³⁶. Além disso, os odontoblastos são células típicas da polpa, as quais se organizam em monocamada para revestir internamente a dentina coronária e radicular. Desta forma, os odontoblastos são as primeiras células, dentro do amplo sistema pulpar, a serem agredidos por componentes tóxicos de materiais dentários capazes de se difundir através das estruturas duras do dente, tais como esmalte e dentina³⁴. Portanto, há mais de uma década esta linhagem celular tem sido empregada para avaliar os efeitos biológicos de diferentes materiais dentários e/ou seus componentes isolados^{15,22,66,77}.

Os resultados do presente trabalho demonstraram que a utilização do gel clareador com 10% de PC pelos períodos de 1, 7 e 14 dias não causou redução significativa do metabolismo celular quando comparado ao controle. De acordo com estudo *in vitro* de Benetti et al.⁶ (2004), ao se aplicar um gel com 10% de PC sobre esmalte de dentes bovinos, pelo período de uma hora, ocorreu penetração de cerca de 0,0712 µg/mL de H₂O₂ na câmara pulpar. Porém, os autores não demonstraram se essa concentração seria capaz de causar efeitos agressivos sobre células pulpares. Em estudo recente realizado por De Lima et al.¹⁸ (2009), a concentração de 0,2547 µg/mL de H₂O₂, proveniente da diluição de um gel clareador com 10% de PC, aplicada diretamente sobre células MDPC-23, não causou redução de metabolismo celular de forma significativa quando comparado ao grupo controle, onde meio de cultura puro foi utilizado. No presente trabalho de pesquisa, a aplicação do PC a 10% por um período ainda maior sobre a superfície de esmalte (8 horas diárias), também não resultou em difusão de componentes do gel clareador em níveis tóxicos capazes de causar intensa agressão sobre as células odontoblastóides em cultura. Apesar de na presente investigação laboratorial não ter sido realizada a identificação e quantificação dos produtos que se difundiram pela estrutura de esmalte e dentina, pode-se sugerir que baixas concentrações de H₂O₂ provenientes de géis

clareadores caseiros com 10% de PC não proporcionam danos significativos sobre células odontoblastóides, diferente do observado para géis clareadores utilizados em consultório, os quais apresentam elevadas concentrações de H_2O_2 em sua composição^{15,22,66,77}.

Portanto, pesquisas realizadas in vitro têm demonstrado que a técnica de clareamento caseiro utilizando PC a 10%, mesmo quando aplicado por 14 dias consecutivos sobre o esmalte, não causa efeitos tóxicos sobre células pulpares em cultura. Porém, numa pesquisa clássica conduzida por Hanks et al.³⁵ (1993), foi observado que a aplicação de géis com 10% de PC sobre discos de dentina com 0,5mm de espessura, resultou em significativa difusão de H_2O_2 mesmo após apenas 15 minutos, o que causou intensos efeitos tóxicos sobre fibroblastos (Blab/c 3T3) em cultura, com redução da viabilidade celular de aproximadamente 60%. Apesar dos autores terem utilizado uma linhagem celular diferente daquela empregada na presente pesquisa, provavelmente a notável variação do resultado descrito por Hanks et al.³⁵ quando comparado aos dados obtidos no presente estudo se deva ao fato dos géis terem sido aplicados diretamente sobre tecidos dentários de diferentes características estruturais. As características tubulares dos discos de dentina com 0,5mm de espessura certamente permitiram uma difusão muito mais rápida de produtos do gel clareador, o que contrasta com os dados da presente pesquisa, onde o gel clareador com 10% de PC foi aplicado sobre esmalte. Neste caso, os produtos liberados do gel teriam que atravessar o tecido mais mineralizado do corpo humano, que é o esmalte, para então alcançar e se difundir através da dentina, a qual apresentava uma espessura quase três vezes maior do que aquela usada por Hanks et al.³⁵ (1993). Assim, pode-se especular que os efeitos dos géis clareadores, mesmo aqueles usados para clareamento caseiro, pode resultar em danos para células pulpares caso estes produtos sejam aplicados sobre áreas de dentina expostas, tal como se observa em casos de retração gengival com exposição de dentina cervical sensível.

Em estudo *in vivo* realizado por Fugaro et al.³¹ (2004), um gel clareador com 10% de PC foi aplicado sobre o esmalte de pré-molares humanos por 6 horas diárias durante 14 dias consecutivos. Os autores mostraram que apenas 1/3 dos dentes submetidos ao clareamento apresentaram discretas alterações histológicas no tecido pulpar, as quais foram reversíveis dentro de duas semanas. Estes dados podem ser explicados pelo fato dos géis clareadores a base de PC promoverem liberação de apenas cerca de 33% de H₂O₂, sendo que esta liberação ocorre de forma lenta e gradual com o objetivo principal de prevenir danos pulpares e periodontais¹⁸. Em estudo realizado por Gokay et al.³² (2005), foi observada menor penetração de H₂O₂ na câmara pulpar proveniente de géis clareadores à base de PC quando comparado com géis clareadores com H₂O₂ na sua forma pura, na mesma concentração. Segundo os autores, a liberação gradativa de H₂O₂ nos géis com PC preveniu a penetração desta molécula na câmara pulpar. Desta forma, pode-se sugerir que a liberação gradativa e lenta de uma pequena quantidade de H₂O₂ a partir do gel clareador com 10% de PC usado na presente pesquisa, pode ter determinado o discreto efeito tóxico do material sobre as células MDPC-23 em cultura.

Na presente pesquisa, nos grupos submetidos ao clareamento com PC a 16%, foi observado redução significativa do metabolismo celular quando comparados com o grupo controle para todos os períodos de aplicação estudados (1, 7 ou 14 dias). De acordo com a literatura, a difusão de produtos do gel clareador é proporcional à sua concentração e tempo de aplicação sobre o esmalte^{6,10,32}. Portanto, o aumento da concentração do gel clareador de 10% para 16% de PC, e a conseqüente elevação do conteúdo de H₂O₂ no gel, provavelmente determinou uma maior difusão de componentes do produto através dos discos de esmalte/dentina, tornando a técnica de clareamento com PC a 16% mais tóxica para as células odontoblastóides, mesmo quando foi realizada apenas uma única aplicação do produto sobre o esmalte. Este fato

também foi observado por Lima et al.⁵³ (2010), onde a aplicação do PC a 16% em discos de dentina por um período de 6 horas resultou em diminuição estatisticamente significativa do metabolismo celular em células MDPC-23.

Essa maior citotoxicidade causada pelo PC a 16%, também pôde ser comprovada pela avaliação microscópica da morfologia e organização das células MDPC-23 sobre o substrato de vidro. Nesta avaliação em MEV, observou-se perda de células do substrato, permanecendo áreas com restos de estruturas celulares, o que caracteriza a ocorrência de lesão e morte das células no local. Já para os grupos com aplicação de PC a 10%, não foi observada redução significativa no número de células sobre o substrato de vidro onde elas haviam sido cultivadas. Porém, foi constatada a ocorrência de discreta redução no tamanho celular, o que parece estar associado a suave agressão causada por este produto, o que resultou em limitada redução no metabolismo das células MDPC-23.

Sabe-se que o H_2O_2 é uma espécie reativa de oxigênio (ERO) e sua degradação leva a formação de outros EROs e de radicais livres. A presença de alta concentração exógena destas moléculas em contato com células, tal como acontece quando da realização de clareamento dentário, pode resultar em apoptose e redução na proliferação celular¹⁴. Já foi observado que células odontoblastóides MDPC-23 tratadas com H_2O_2 tiveram aumento significativo da produção de EROs intracelular, resultando em estresse oxidativo⁵⁷. Porém, numa pesquisa recente, foi demonstrado que o estresse oxidativo gerado por baixas concentrações de H_2O_2 em contato com células pode resultar no aumento da atividade da fosfatase alcalina (ALP) e mineralização da matriz extracelular, os quais são marcadores celulares para produção de dentina⁵⁰.

Na presente pesquisa, especialmente nos grupos onde foram realizadas 7 ou 14 aplicações do gel clareador, o extrato final obtido para ser aplicado sobre as células em cultura, foi aquele referente apenas à última aplicação do produto na superfície dentária. Desta maneira, foi

possível avaliar se as possíveis alterações nos tecidos duros do dente resultantes de longos períodos de aplicação do gel clareador proporcionariam maior difusão trans-amelodentinária de componentes tóxicos e conseqüentemente aumento da citotoxicidade. Assim, no presente estudo, foram avaliadas as possíveis alterações na estrutura do esmalte submetido ao protocolo de clareamento empregado no teste da citotoxicidade, sendo realizada a análise da microdureza Knoop e da morfologia superficial por MEV.

A mensuração da microdureza é considerada um teste simples que determina a propriedade mecânica superficial do esmalte relacionada ao ganho ou perda de minerais. Esta técnica é frequentemente utilizada para avaliar os efeitos de agentes clareadores na estrutura dental⁴³. No presente estudo, foi observada redução significativa da microdureza do esmalte após 7 e 14 aplicações do gel clareador com 10% de PC. Já para o grupo onde o PC a 16% foi aplicado, redução significativa da microdureza foi observada em todos os períodos avaliados, inclusive 1 dia após o clareamento, sendo a redução mais significativa após 14 aplicações do produto na superfície dental. No entanto, apesar das alterações estruturais observadas no presente estudo terem sido proporcionais ao período de aplicação do produto, de acordo com os resultados obtidos no teste da citotoxicidade estas alterações não determinaram maior difusão de produtos tóxicos para as células odontoblastóides.

Diversos estudos demonstraram que a utilização de géis clareadores com 10% de PC gera alterações químicas e estruturais na superfície do esmalte. Em estudo realizado por McCracken, Haywood⁵⁶ (1996), a aplicação por 6 horas do gel clareador com PC a 10% sobre o esmalte resultou em diminuição significativa no conteúdo de cálcio deste tecido dentário. Já no estudo realizado por Potocnik et al.⁶¹ (2000), a superfície de esmalte submetida ao clareamento com PC em baixas concentrações não apresentou alterações na microdureza Vickers, no

entanto foi observada diminuição significativa da proporção de cálcio e fósforo. Em outros estudos, foi observada redução significativa da microdureza Knoop do esmalte submetido ao clareamento com PC a 10% diariamente por 6 ou 8 horas pelo período de 21 dias^{65,72}. No entanto, os estudos demonstram que essas alterações são superficiais, limitando-se à uma profundidade em torno de 20 a 50 μm , não sendo observadas alterações no esmalte profundo e na junção amelodentinária^{25,78}, mesmo após aplicações diárias por 8 horas pelo período de 14 dias²⁵.

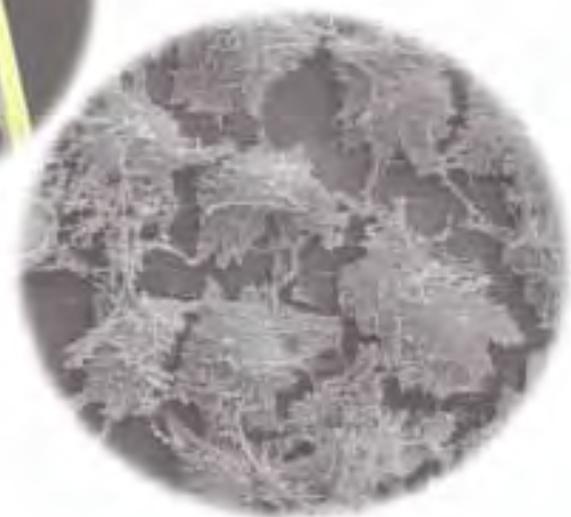
Com relação a morfologia superficial do esmalte, no presente estudo a aplicação de gel com PC a 10% durante 14 dias não resultou em alterações morfológicas neste tecido mineralizado, tal como observado para o grupo controle. No entanto, para o esmalte submetido ao clareamento com PC a 16%, a superfície deste tecido dental apresentou-se mais irregular e com uma maior quantidade de poros. Diversos estudos demonstraram aumento na porosidade do esmalte após o clareamento e essas alterações são observadas após longos tempos de contato do produto com a superfície dental (6 a 8 horas) por períodos superiores a 7 dias^{24,40,61}. No estudo realizado por Dudea et al.²⁴ (2009), uma única aplicação do PC a 15% por 3 ou 8 horas não resultou em alterações significantes na micromorfologia superficial do esmalte. No entanto, quando o produto foi aplicado por 14 dias consecutivos, foram observadas áreas de erosão superficiais significativas. De forma semelhante, Hegeduz et al.⁴⁰ (1999) observaram por microscopia de força atômica que o esmalte submetido à sete aplicações consecutivas do PC a 10% apresentou uma superfície mais porosa.

Os mecanismos pelos quais os agentes clareadores promovem alterações estruturais no esmalte ainda não foram completamente esclarecidos. Uma hipótese é que o pH dos géis clareadores atua na desmineralização do esmalte⁷³. Porém, o pH dos géis clareadores caseiros, tal como os usados na presente pesquisa, varia entre 5,6 e 7,3 e a uréia liberada durante a degradação do PC eleva o pH num período de

15 minutos⁶². Como o pH crítico para a dissolução do esmalte está entre 5,2 e 5,8, é provável que o pH dos géis clareadores caseiros não tenha relação com as alterações observadas no esmalte. Desta forma, as alterações estruturais parecem estar relacionadas com a ação oxidante do H₂O₂ sobre o esmalte. Segundo Kwon et al.⁵⁰ (2002), os poros formados na superfície do esmalte após o clareamento ocorrem devido ao rompimento da matriz protéica do esmalte e subsequente perda do material cristalino envolvido por esta matriz. Esta hipótese é decorrente da observação em diversos estudos de que a dissolução do esmalte ocorre de forma heterogênea, com áreas de erosão intercaladas com áreas de esmalte íntegro^{12,40,50,73}. Segundo os autores, como a distribuição de proteínas e outros materiais orgânicos não é uniforme pela superfície de esmalte, os defeitos observados após o clareamento ocorrem de forma heterogênea⁵⁰. Outros estudos demonstraram que degradações ocorrem principalmente nas regiões interprismáticas e em áreas de hipomineralização do esmalte, que são as regiões que apresentam a maior quantidade de material orgânico^{12,73}. Desta forma, acredita-se que as alterações no esmalte são decorrentes da desestruturação da matriz orgânica, deixando este tecido mais poroso, o que favorece a difusão do H₂O₂ e seus produtos de degradação em direção à dentina e conseqüentemente na câmara pulpar⁵⁰. Apesar dos estudos terem demonstrado alterações significantes na estrutura do esmalte após a aplicação de géis clareadores com 10% de PC, no presente trabalho a aplicação do gel por 8 horas diárias durante um período de até 14 dias não resultou em danos significativos às células de linhagem odontoblástica. Desta forma, pode-se sugerir que as alterações que ocorrem no esmalte são sutis e tenham se limitado apenas às estruturas duras superficiais do dente. Já para o PC a 16%, alterações mais significativas foram observadas, aumentando a porosidade do esmalte, o que provavelmente permitiu uma maior penetração e difusão dos produtos tóxicos provenientes do gel clareador pela estrutura dental.

No presente estudo in vitro, a aplicação dos géis clareadores seguiu o protocolo clínico empregado frequentemente na técnica de clareamento caseiro. Diante dos resultados obtidos na presente pesquisa, pode-se especular que o clareamento com PC a 10% apresenta poucos riscos de causar alterações pulpares e estruturais nos dentes clareados e pode ser utilizada de forma segura, promovendo o mesmo nível de clareamento quando comparado ao gel a 16%⁷⁴. Porém, fatores como pressão intrapulpar, fluido dentinário e presença de prolongamentos citoplasmáticos dos odontoblastos, colágeno e outros componentes nos túbulos dentinários⁶⁸ podem interferir na difusão dos componentes de géis clareadores in vivo. Além disso, a polpa dentária apresenta um sistema de vasos linfáticos que participa da eliminação de produtos externos que alcançam este tecido conjuntivo. Outro fator importante é a presença de enzimas antioxidantes como a catalase, superóxido dismutase, peroxidases além das vitaminas A e E e do ácido ascórbico que atuam na degradação enzimática do H₂O₂¹⁴. Portanto, os resultados da presente pesquisa demonstraram que os menores efeitos tóxicos in vitro ocorreram para o tratamento realizado com gel clareador com 10% de PC quando comparado ao gel com 16% de PC. Porém, desde que todos os fatores fisiológicos acima descritos podem interferir no processo de dano e reparação do tecido pulpar, estudos clínicos são necessários para avaliar a segurança de aplicação da técnica de clareamento caseiro utilizando géis clareadores com 16% de PC

Conclusão



7 Conclusão

De acordo com a metodologia empregada neste estudo pode-se concluir que:

1. Independente do número de aplicações do gel clareador com 10% de PC sobre a superfície de esmalte, o produto não resultou em citotoxicidade trans-amelodentinária para as células MDPC-23. Entretanto, a citotoxicidade ocorreu mesmo após uma única aplicação do gel clareador com 16% de PC sobre o esmalte;

2. A aplicação do PC a 10% resultou em diminuição da microdureza do esmalte apenas após sete aplicações. As alterações na estrutura do esmalte foram mais significativas quando o clareamento foi realizado com PC a 16%.

Referências



8 Referências*

1. American Dental Association (ADA) [internet]. Acceptance Program Guidelines. Dentist dispensed home-use tooth bleaching products. [citado 2006 Nov 7]. Disponível em: http://www.ada.org/sections/scienceAndResearch/pdfs/guide_home_bleach.pdf.
2. American Dental Association (ADA) [internet]. Accepted Over-the-Counter Products. [citado 2007 Jan 10]. Disponível em: http://www.ada.org/sections/scienceAndResearch/pdfs/adaseal_consumer_shopping.pdf.
3. Ames JW. Removing stains from mottled enamel. Dent Cosmos. 1937; 1674-7.
4. Anderson DG, Chiego DJ, Glickman GN, McCauley. A clinical assessment of the effects of 10% carbamide peroxide gel on human pulp tissue. J Endod. 1999; 25: 247-50.
5. Aushill TM, Hellwig E, Schmidale S, Sculean A, Arweiler NB. Efficacy, side effects and patients' acceptance of different bleaching techniques (OTC, in-office, at-home). Oper Dent. 2005; 30: 156-63.
6. Benetti AR, Valera MC, Mancini MN, Miranda CB, Balducci I. In vitro penetration of bleaching agents into the pulp chamber. Int Endod J. 2004; 37: 120-4.

*De acordo com o estilo Vancouver disponível no site: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

7. Bistey T, Nagy IP, Simó A, Hegedus C. In vitro FT-IR study of the effects of hydrogen peroxide on superficial tooth enamel. *J Dent.* 2007; 35: 325-30.
8. Bowles WH, Ugwuneri Z. Pulp chamber penetration by hydrogen peroxide following vital bleaching procedures. *J Endod.* 1987; 13: 375-7.
9. Buchalla W, Attin T. External bleaching therapy with activation by heat, light or laser--a systematic review. *Dent Mater.* 2007; 23: 586-96.
10. Camargo SE, Cardoso PE, Valera MC, de Araújo MA, Kojima AN. Penetration of 35% hydrogen peroxide into the pulp chamber in bovine teeth after LED or Nd:YAG laser activation. *Eur J Esthet Dent.* 2009; 4: 82-8.
11. Camargo SEA, Valera MC, Camargo CHR, Mancini MNG, Menezes MM. Penetration of 38% hydrogen peroxide into the pulp chamber in bovine and human teeth submitted to office bleach technique. *J Endod.* 2007; 33: 120-4.
12. Cavalli V, Arrais CA, Giannini M, Ambrosano GM. High-concentrated carbamide peroxide bleaching agents effects on enamel surface. *J Oral Rehabil.* 2004; 31: 155-9.
13. Caviedes-Bucheli J, Ariza-García G, Restrepo-Méndez S, Ríos-Osorio N, Lombana N, Muñoz HR. The effect of tooth bleaching on substance P expression in human dental pulp. *J Endod.* 2008; 34: 1462-5.
14. Cecarini V, Gee J, Fioretti E, Amici M, Angeletti M, Eleuteri AM, Keller JN. Protein oxidation and cellular homeostasis: Emphasis on metabolism. *Biochim Biophys Acta.* 2007; 1773: 93-104.

15. Coldebella CR, Ribeiro AP, Sacono NT, Trindade FZ, Hebling J, Costa CA. Indirect cytotoxicity of a 35% hydrogen peroxide bleaching gel on cultured odontoblast-like cells. *Braz Dent J.* 2009; 20: 267-74.
16. Cooper JS, Bokmeyer TJ, Bowles WH. Penetration of the pulp chamber by carbamide peroxide bleaching agents. *J Endod.* 1992; 18: 315-7.
17. Dahl JE, Pallesen U. Tooth bleaching – a critical review of the biological aspects. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2003; 14: 292-304.
18. De Lima AF, Lessa FCR, Mancini MNG, Hebling J, De Souza Costa CA, Marchi GM. Cytotoxic effects of different concentrations of a carbamide peroxide bleaching gel on odontoblast-like cells MDPC-23. *J Biomed Mater Res Part B: Appl Biomater.* 2009; 90B: 907-12.
19. De Souza Costa CA, Duarte PCT, Souza PPC, Giro EMA, Hebling J. Cytotoxic effects and pulpal response caused by a mineral trioxide aggregate formulation and calcium hydroxide. *Am J Dent.* 2007; 21: 255-61.
20. De Souza Costa CA, Riehl H, Kina JF, Sacono NT, Hebling J. Human pulp responses to in-office tooth bleaching. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2010; 109: 59-64.
21. Demarco FF, Meireles SS, Masotti AS. Over-the-counter whitening agents: a concise review. *Braz Oral Res.* 2009; 23 (Suppl 1): S64-70.
22. Dias Ribeiro AP, Sacono NT, Lessa FCR, Nogueira I, Coldebella CR, Hebling J, et al. Cytotoxic effect of a 35% hydrogen peroxide bleaching gel on odontoblast-like MDPC-23 cells. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2009; 108: 458-64.

23. Donly KJ, Segura A, Henson T, Barker ML, Gerlach RW. Randomized controlled trial of professional at-home tooth whitening in teenagers. *Gen Dent.* 2007; 55: 669-74.
24. Dudea D, Florea A, Miha C, Câmpeanu R, Nicola C, Benga G. The use of scanning electron microscopy in evaluating the effect of a bleaching agent on the enamel surface. *Rom J Morphol Embryol.* 2009; 50: 435-40.
25. Efeoglu N, Wood D, Efeoglu C. Microcomputerised tomography evaluation of 10% carbamide peroxide applied to enamel. *J Dent.* 2005; 33: 561-7.
26. Faraoni-Romano JJ, Turssi CP, Serra MC. Effect of a 10% carbamide peroxide on wear resistance of enamel and dentine: in situ study. *J Dent.* 2009; 37: 273-8.
27. Faraoni-Romano JJ, Silveira AG, Turssi CP, Serra MC. Bleaching agents with varying concentrations of carbamide and/or hydrogen peroxides: effect on dental microhardness and roughness. *J Esthet Restor Dent.* 2008; 20: 395-404.
28. Fischer G. The bleaching of discolored teeth with H₂O₂. *Dent Cosmos.* 1910; 53: 246-7.
29. Fonseca RB, Haiter-Neto F, Fernandes-Neto AJ, Barbosa GA, Soares CJ. Radiodensity of enamel and dentin os human, bovine and swine teeth. *Arch Oral Biol* 2004; 49: 919-22.
30. Forner L, Salmerón-Sánchez M, Palomares M, Llena C, Amengual J. The use of atomic force microscopy in determining the stiffness and adhesion force of human dentin after exposure to bleaching agents. *J Endod.* 2009; 35: 1384-6.

31. Fugaro JO, Nordahl I, Fugaro OJ, Matis BA, Mjör IA. Pulp reaction to vital bleaching. *Oper Dent*. 2004; 29: 363-8.
32. Gökay O, Müjdecı A, Algin E. In vitro peroxide penetration into the pulp chamber from newer bleaching products. *Int Endod J*. 2005; 38: 516-20.
33. Gökay O, Yılmaz 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: 92-4
34. Goldberg M, Smith AJ. Cells and extracellular matrices of dentin and pulp: a biological basis for repair and tissue engineering. *Crit Rev Oral Biol Med* 2004; 15: 13-27.
35. Hanks CT, Fat JC, Wataha JC, Corcoran JF. Cytotoxicity and dentin permeability of carbamide peroxide and hydrogen peroxide vital bleaching materials, in vitro. *J Dent Res*. 1993; 72: 931-8.
36. Hanks CT, Sun ZL, Fang DN, Edwards CA, Wataha JC, Ritchie HH, Butler WT. Cloned 3T6 cell line from CD-1 mouse fetal molar dental papillae. *Connect Tissue Res* 1998; 37: 233-49.
37. Harris EF, Hicks JD. A radiographic assessment of enamel thickness in human maxillary incisors. *Arch Oral Biol*. 1998; 43: 825-31.
38. Haywood VB, Drake M. Research on whitening teeth makes news. *NC Dent Rev*. 1990; 7: 9.
39. Haywood VB, Heymann HO. Nightguard vital bleaching. *Quintessence Int*. 1989; 20: 173-6.
40. Hegedüs C, Bistey T, Flóra-Nagy E, Keszthelyi G, Jenei A. An atomic force microscopy study on the effect of bleaching agents on enamel surface. *J Dent*. 1999; 27: 509-15.

41. Jacques P, Hebling J. Effect of dentin conditioners on the microtensile bond strength of a conventional and a self-etching primer adhesive system. *Dent Mater.* 2005; 21: 103-9.
42. Joiner A. Tooth colour: a review of the literature. *J Dent.* 2004; 32: 3-12.
43. Joiner A. Review of the effects of peroxide on enamel and dentine properties. *J Dent.* 2007; 35: 889-96.
44. Joiner A, Thakker G. In vitro evaluation of a novel 6% hydrogen peroxide tooth whitening product. *J Dent.* 2004; 32: 19- 25.
45. Kawamoto K, Tsujimoto Y. Effects of the hydroxyl radical and hydrogen peroxide on tooth bleaching. *J Endod.* 2004; 56: 274-7.
46. Kina JF, Huck C, Martinez TC, Sacono NT, Ribeiro APD, Costa CAS. Response of human pulps after professionally applied vital tooth bleaching. *Int Endod J.* 2010; 43: 572-80.
47. Kingsbury CA. Discoloration of dentine. *Dent Cosmos.* 1981; 3: 57-60
48. Kirk EC. The chemical bleaching of teeth. *Dent Cosmos.* 1889; 31: 273-5.
49. Krifka S, Borzsonyi A, Koch A, Hiller KA, Schmalz G, Friedl KH. Bond strength of adhesive systems to dentin and enamel – human vs. bovine primary teeth in vitro. *Dent Mater* 2008; 24: 888-94.
50. Kwon YH, Huo MS, Kim KH, Kim SK, Kim YJ. Effects of hydrogen peroxide on the light reflectance and morphology of bovine enamel. *J Oral Rehabil.* 2002; 29: 473-7.

51. Lee DH, Lim BS, Lee YK, Yang HC. Effects of hydrogen peroxide (H₂O₂) on alkaline phosphatase activity and matrix mineralization of odontoblast and osteoblast cell lines. *Cell Biol Toxicol.* 2006; 22: 39-46.
52. Lee KH, Kim HI, Kim KH, Kwon YH. Mineral loss from bovine enamel by a 30% hydrogen peroxide solution. *J Oral Rehabil.* 2006; 33: 229-33.
53. Lima AF, Lessa FCR, Mancini MNG, Hebling J, De Souza Costa CA, Marchi GM. Transdentinal protective role of sodium ascorbate against the cytopathic effects of H₂O₂ released from bleaching agents. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 2010; 109: 70-6.
54. Markowitz K. Pretty painful: why does tooth bleaching hurt? *Med Hypotheses.* 2010; 74: 835-40.
55. Matsui S, Takahashi C, Tsujimoto Y, Matsushima K. Stimulatory effects of low-concentration reactive oxygen species on calcification ability of human dental pulp cells. *J Endod.* 2009; 35: 67-72.
56. McCracken MS, Haywood VB. Demineralization effects of 10 percent carbamide peroxide. *J Dent.* 1996; 24: 395-8.
57. Min KS, Lee HJ, Kim SH, Lee SK, Kim HR, Pae HOP et al. Hydrogen peroxide induces heme oxygenase-1 and dentin sialophosphoprotein mRNA in human pulp cells. *J Endod.* 2008; 34: 983-9.
58. Minoux M, Serfaty R. Vital tooth bleaching: biologic adverse effects- a review. *Quintessence Int.* 2008; 39: 645-59.
59. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983; 65: 55-63.

- 60.Owens BM, Rowland CC, Brown DM, Covington JS 3rd. Postoperative dental bleaching: effect of microleakage on class V tooth colored restorative materials. *J Tenn Dent Assoc.* 1998; 78: 36-40.
61. Potocnik I, Kosec L, Gaspersic D. Effect of 10% carbamide peroxide bleaching gel on enamel microhardness, microstructure, and mineral content. *J Endod.* 2000; 26: 203-6.
- 61.Price RB, Sedarous M, Hiltz GS. The pH of tooth- whitening products. *J Can Dent Assoc.* 2000; 66: 421-6.
- 62.Robertson WD, Melfi R.C. Pulpal response to vital bleaching procedures. *J Endod.* 1980; 6: 645-9.
- 63.Robinson C, Shore RC, Brookes SJ, Strafford S, Wood SR, Kirkham J. The chemistry of enamel caries. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2000; 11: 481–95.
- 64.Rodrigues JA, Marchi GM, Ambrosano GM, Heymann HO, Pimenta LA. Microhardness evaluation of in situ vital bleaching on human dental enamel using a novel study design. *Dent Mater.* 2005; 21: 1059-67.
- 65.Sacono NT, Coldebella CR, Ribeiro APD, Soares DGS, Trindade FZ, Hebling J, et al. Efeito citotóxico de agentes clareadores a base de peróxido de hidrogênio a 20% e 38% sobre células odontoblastóides. *Rev Odontol Bras Central.* 2010; 18: 15-21.
- 66.Sasaki RT, Arcanjo AJ, Flório FM, Basting RT. Micromorphology and microhardness of enamel after treatment with home-use bleaching agents containing 10% carbamide peroxide and 7.5% hydrogen peroxide. *J Appl Oral Sci.* 2009; 17: 611-6.

67. Sauro S, Pashley DH, Montanari M, Chersoni S, Carvalho RM, Toledano M, et al. Effect of simulated pulpal pressure on dentin permeability and adhesion of self-etch adhesives. *Dent Mater.* 2007; 23: 705-13.
68. Schmalz G, Hiller KA, Nunes LJ, Stoll J, Weis K. Permeability characteristics of bovine and human dentin under different pretreatment conditions. *J Endod* 2001; 27: 23-30.
69. Seale NS, Wilson CF. Pulpal response to bleaching of teeth in dogs. *Pediatr Dent.* 1985; 7: 209-14.
70. Seale NS, McIntosh JE, Taylor AN. Pulpal reaction to bleaching of teeth in dogs. *J Dent Res.* 1981; 60: 948-53.
71. Soldani P, Amaral CM, Rodrigues JA. Microhardness evaluation of in situ vital bleaching and thickening agents on human dental enamel. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 2010; 30: 203-11.
72. Spalding M, Taveira LAA, Assis GF. Scanning electron microscopy study of dental enamel surface exposed to 35% hydrogen peroxide: alone, with saliva, and with 10% carbamide peroxide. *J Esthet Restor Dent* 2003.15:154-65.
73. Sulieman MA. An overview of tooth-bleaching techniques: chemistry, safety and efficacy. *Periodontol 2000.* 2008; 48: 148-69.
74. Sun G. The role of lasers in cosmetic dentistry. *Dent Clin North Am.* 2000; 26: 92-4.
75. Swift Jr EJ. Restorative considerations with vital tooth bleaching. *J Am Dent Assoc.* 1997; 128 (Suppl): 60S-4S.

76. Trindade FZ, Ribeiro APD, Sacono NT, Oliveira CF, Lessa FCR, Hebling J, et al. Trans-enamel and trans-dentinal cytotoxic effects of a 35% H₂O₂ bleaching gel on cultured odontoblast cell lines after consecutive applications. *Int Endod J.* 2009; 42: 516-24.
77. Ushigome T, Takemoto S, Hattori M, Yoshinari M, Kawada E, Oda Y. Influence of peroxide treatment on bovine enamel surface--cross-sectional analysis. *Dent Mater J.* 2009; 28: 315-23.
78. Watts A, Addy M. Tooth discolouration and staining: a review of the literature. *Br Dent J.* 2001; 190: 309-15.
79. Wetter NU, Branco EP, Deana AM, Pelino JE. Color differences of canines and incisors in comparative long term clinical trial of three bleaching systems. *Lasers Med Sci.* 2009; 24: 941-7.
80. Zantner C, Beheim-Schwarzbach N, Neumann K, Kielbassa AM. Surface microhardness of enamel after different home bleaching procedures. *Dent Mat.* 2007; 2: 243-50.

Autorizo a reprodução deste trabalho.
(Direitos de publicação reservado ao autor)

Araraquara, 16 de novembro de 2010.

DIANA GABRIELA DE SOUSA SOARES