



UNESP - Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



Rafael Antonio de Oliveira Ribeiro

**Desenvolvimento de estratégias inovadoras para clareamento dental de consultório:
eficácia estética e biocompatibilidade associadas à redução do tempo clínico**

Araraquara

2024



UNESP - Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



Rafael Antonio de Oliveira Ribeiro

**Desenvolvimento de estratégias inovadoras para clareamento dental de consultório:
eficácia estética e biocompatibilidade associadas à redução do tempo clínico**

Tese apresentada à Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Odontologia, Araraquara para obtenção do título de Doutor em Odontologia, na Área de Reabilitação Oral

Orientador: Dr. Carlos Alberto de Souza Costa

Araraquara

2024

R484d

Ribeiro, Rafael Antonio de Oliveira

Desenvolvimento de estratégias inovadoras para clareamento dental de consultório : eficácia estética e biocompatibilidade associadas à redução do tempo clínico / Rafael Antonio de Oliveira Ribeiro. -- , 2024

97 p.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Odontologia, Araraquara,

Orientador: Carlos Alberto de Souza Costa

1. Clareamento dental. 2. Estética. 3. Toxicidade. 4. Polpa dentária.
I. Título.

Rafael Antonio de Oliveira Ribeiro

**Desenvolvimento de estratégias inovadoras para clareamento dental de consultório:
eficácia estética e biocompatibilidade associadas à redução do tempo clínico**

Tese para obtenção do grau de Doutor em Odontologia

Comissão Julgadora

Presidente e Orientador: Dr. Carlos Alberto de Souza Costa

2o Examinadora: Profa. Dra. Vanessa Cavalli Gobbo

3o Examinador: Profa. Dra. Ester Alves Ferreira Bordini

4o Examinador: Prof Dr. Gelson Luis Adabo

Araraquara, 19 de agosto de 2024

DADOS CURRICULARES

Rafael Antonio De Oliveira Ribeiro

NASCIMENTO **03.11.1994**

FILIAÇÃO **Severino Antonio Sobrinho**
 Nelma Maria de Oliveira Ribeiro

2013-2017 **Graduação em Odontologia pela Universidade Federal de Pernambuco – UFPE**

2018-2020 **Pós-graduação – Mestrado pelo Programa de Reabilitação Oral da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP.**

2020-2024 **Pós-graduação – Doutorado pelo Programa de Odontologia da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP.**

Quantas mãos são necessárias para escrever uma tese?

Esta tese recebe meu nome, encerra mais um ciclo da minha jornada acadêmica e me dá o título de doutor. Contudo, este é mais um título individual que conta uma história coletiva. O que seria de mim sem o apoio de todos que me ajudaram até aqui? O que sou sem as histórias que me inspiraram e me fizeram chegar até aqui? O que sou eu, enquanto pedra bruta, sem as mãos que me lapidaram para chegar até este ponto?

Por isso, deixo aqui meus agradecimentos. Aos meus pais, Nelma Maria e Severino Antonio, que me ensinaram o significado de casa e são as raízes que sustentam minha árvore, mesmo diante da maior tempestade. Sem vocês, nada disso seria possível. Por vocês, meu amor eterno. À generosidade do meu irmão, Rodrigo César, e de sua esposa, Camylla Estevam, o amor de vocês é fonte de inspiração. Vocês me deram a possibilidade de ser tio; este trabalho também é dedicado a Maria Luiza Estevam Ribeiro. Ao inabalável e admirável Professor Carlos Alberto de Souza Costa, meu orientador, suas mãos moldaram este trabalho e me moldaram ao longo da pós-graduação. Ter sido seu orientado é um presente. Aos meus familiares e amigos, o apoio de vocês foi fundamental para que eu pudesse chegar até aqui. Aos meus guias e mestres, que sussurraram em meu ouvido que, das minhas mãos, tudo era capaz de brotar e florir, o fruto deste trabalho também é de vocês. Um agradecimento especial à Marina de Oliveira Ribeiro, minha avó e uma das maiores professoras que tive. Seus olhos não puderam enxergar minha trajetória até aqui, e o Alzheimer te fez perder as palavras. Todas as palavras que estão aqui são suas. Eu vivo na esperança de te reencontrar.

Este trabalho também é dedicado a todas as pessoas que precisaram adiar seus sonhos por falta de acesso à educação. Saibam que o esforço pode até contar, mas é a oportunidade que define. O que diferencia minha jornada acadêmica da delas é a oportunidade. Que este trabalho possa ser uma homenagem a essas vozes, na esperança de um futuro em que suas vidas possam ser transformadas através da educação.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À Professora **Josimeri Hebling**, a qual contribuiu de maneira muito significativa para a completa realização deste trabalho, através de seu conhecimento e suas ideias, as quais foram transmitidas com todo carisma e carinho. Muito obrigado!

Aos Professores **Hilcia Mezzalira** e **Alexandre Nascimento**, agradeço por despertarem o meu desejo pelo mundo acadêmico, por todos os conhecimentos passados e por todo apoio durante a fase de seleção. Vocês foram fundamentais para meu crescimento. Muito obrigado!

À família que eu construí em Araraquara, **Caroline Anselmi, Igor Soares, Juliana Rios, Victória Peruchi, Filipe Koon, Maria Luiza, Lídia Fernandes, Vinicius Krieger, Luana Dias, Larissa Félix, Camila Cavaça, Letícia Melo** por todos os momentos vividos, pelas conversas e por toda ajuda ao longo do desenvolvimento deste trabalho. Obrigado pela convivência e por todo amor ao longo desse tempo.

Aos meus amigos de longa data **Aída Cecília, Rhyan Marques e Thamyres Alves**, mesmo que distante foram um ponto de apoio ao longo de todo tempo. Muito obrigado pelos conselhos e pelo crescimento proporcionado. Amo vocês!

Aos alunos de iniciação científica que me acompanharam ao longo do desenvolvimento do trabalho e que me ajudaram de forma imensurável **Matheus Bolonhezi, Leonardo Sônego, Alex Pereira, Felipe Sales, Adrielly Moraes, Stephanie Lissa**.

As amigas **Maria Luiza, Lays Nóbrega e Uxua Ortecho**; vocês foram como irmãs, me ajudaram durante os momentos que eu mais precisei, agradeço a oportunidade maravilhosa que foi conviver com vocês no início da minha caminhada.

Aos Professores **Gelson Adabo, André Briso e Vanessa Cavalli** pelas incontáveis vezes que leram e contribuíram com o meu trabalho, vocês são fonte de inspiração.

À família **Ribeiro e Cabral**, com todos os tios(as), primos(as) que sempre foram meu alicerce e meu motivo para persistir. Vocês foram e são essenciais em todas as minhas conquistas.

A minha família espiritual do **Templo Escola de Umbanda Luz do Arco Íris**, por todo apoio emocional durante a trajetória do doutorado e por ser um porto seguro para meu desenvolvimento pessoal e espiritual.

AGRADECIMENTOS

À **Faculdade de Odontologia de Araraquara** (FOAr-UNESP), representada pela Diretora Profa. Dra. Patrícia Petromilli Nordi Sasso Garcia e pela Vice-Diretora Profa. Dra. Elaine Pereira da Silva Tagliaferro, que através de todos seus funcionários e professores, possibilitaram a conclusão desta etapa em minha vida.

Ao **Laboratório de Patologia Experimental e Biomateriais** da FOAr-UNESP) do Departamento de Fisiologia e Patologia, representado pelo seu coordenador Dr. Carlos Alberto de Souza Costa, local de realização da presente pesquisa.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Odontologia**, representado pelo coordenador Prof. Dr. Paulo Sergio Cerri e pela Vice-coordenadora Dra. Morgana Rodrigues Guimarães-Stabili e a todos os funcionários e professores que contribuíram para minha formação nesta etapa da pós-graduação.

À **CAPES**: O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – 001

À **FAPESP** – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (processo nº 2021/01184-4) pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

“Vou aprender a ler pra ensinar meus camaradas.”

Joao Roberto Caribe Mendes e Capinan*

* Yá Yá Massemba. Intérprete: Maria Bethânia. Compositores: Joao Roberto Caribe Mendes e Capinan. In: BRASILEIRINHO. Intérprete: Maria Bethânia. Rio de Janeiro: Biscoito Fino, 2002. CD, faixa 2 (4 min16 s).

Ribeiro RAO. Desenvolvimento de estratégias inovadoras para clareamento dental de consultório: eficácia estética e biocompatibilidade associadas à redução do tempo clínico [tese de doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2024.

RESUMO

Apesar do excelente resultado estético obtido com o clareamento dental de consultório, o qual utiliza géis clareadores com elevadas concentrações de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), esta terapia profissional pode resultar em danos pulpare irreversíveis e sensibilidade pós-tratamento. Assim, alguns novos protocolos, baseados na redução da concentração de H_2O_2 nos géis e/ou do tempo de aplicação deles sobre os dentes, têm sido propostos. Entretanto, foi demonstrado que esses novos protocolos afetam negativamente o resultado estético do procedimento ou requerem a aplicação de diversas sessões clareadoras, o que inviabiliza sua implementação clínica. Diante destes fatos, torna-se necessário desenvolver estratégias de clareamento profissional que sejam rápidas e que favoreçam o resultado estético, sem agredir a polpa e causar desconforto para os pacientes. Desta forma, o objetivo geral deste estudo foi utilizar os conhecimentos de engenharia de biomateriais e processos oxidativos avançados (POA), para desenvolver biomateriais poliméricos catalisadores a serem usados para recobrir o esmalte dentário previamente à aplicação do gel clareador, o qual desse ver irradiado (fotocatálise) com LED violeta (LEDv). Num primeiro momento (Publicação 1 do projeto), foi avaliada a possível influência de diferentes moléculas coloridas (cromóforos) sobre a difusão trans-amelodentinária de H_2O_2 liberado dos géis clareadores e seus efeitos citotóxicos. Foi observado que os diferentes cromóforos presentes no esmalte/dentina não interferem na citotoxicidade da terapia clareadora, independentemente do tipo de solução de manchamento utilizada (café, chá, vinho ou o blend das soluções). Na sequência (Publicação 2 do projeto), foi observado que apesar da irradiação do gel clareador de consultório com LEDv aumentar a eficácia clareadora, este procedimento de fotocatalise não previne ou reduz a citotoxicidade comumente causada por esta modalidade de terapia profissional. Foi determinado ainda, que ampliar o tempo de irradiação do gel não aumenta a eficácia clareadora e nem reduz a citotoxicidade do tratamento. Com base nos conhecimentos adquiridos até então, foi possível executar a Publicação 3 do projeto, onde um scaffold nanofibrilar (SN) e um primer polimérico catalisador (PPC) foram desenvolvidos. Esses biomateriais catalisadores foram usados para revestir o esmalte dentário antes da aplicação do gel clareador, o qual foi irradiado ou não com LEDv. Foi observado que o uso combinado de SN+PPC+LEDv aumenta a eficácia estética do clareamento convencional de consultório, de tal forma que o resultado esperado pode ser alcançado num tempo mais curto e sem causar intensos efeitos citotóxicos para células pulpare. Na Publicação 4 do projeto, foi determinado que a estratégia de irradiar (LEDv) um gel clareador de consultório, aplicado por apenas 15 minutos sobre o esmalte previamente recoberto com SN+PPC, causa apenas discreto estresse oxidativo sobre células pulpare. Assim, esta inovadora estratégia clareadora, a qual é baseada na catálise química/fotocatálise do H_2O_2 , além de acelerar o resultado estético, também causa limitado efeito tóxico sobre células da polpa, as quais exibem baixa expressão de mediadores inflamatórios e elevada expressão de marcadores para mineralização.

Palavras-chave: Clareamento dental. Estética. Toxicidade. Polpa dentária.

Ribeiro RAO. Development of an innovative strategy for in-office tooth bleaching: aesthetic effectivity and biocompatibility associated with reduced clinical time [tese de doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2024.

ABSTRACT

Despite the excellent aesthetic results obtained with in-office dental whitening, which uses whitening gels with high concentrations of hydrogen peroxide (H_2O_2), this professional therapy can result in irreversible pulp damage and post-treatment sensitivity. Therefore, some new protocols, based on reducing the concentration of H_2O_2 in the gels and/or the application time on the teeth, have been proposed. However, it has been demonstrated that these new protocols negatively affect the aesthetic outcome of the procedure or require the application of multiple whitening sessions, making their clinical implementation unfeasible. In light of these facts, it is necessary to develop professional whitening strategies that are quick and favor the aesthetic result without harming the pulp and causing discomfort to the patients. Thus, the overall objective of this study was to utilize the knowledge of biomaterials engineering and advanced oxidative processes (AOP) to develop catalytic polymeric biomaterials to be used to coat the dental enamel prior to the application of the whitening gel, which would then be irradiated (photocatalysis) with violet LED (LEDv). Initially (Phase 1 of the project), the possible influence of different colored molecules (chromophores) on the trans-enamel-dentin diffusion of H_2O_2 released from the whitening gels and their cytotoxic effects was evaluated. It was observed that the different chromophores present in the enamel/dentin do not interfere with the cytotoxicity of the whitening therapy, regardless of the type of staining solution used (coffee, tea, wine, or a blend of the solutions). Subsequently (Phase 2 of the project), it was observed that although the irradiation of the in-office whitening gel with LEDv increases the whitening efficacy, this photocatalysis procedure does not prevent or reduce the cytotoxicity commonly caused by this type of professional therapy. It was also determined that increasing the irradiation time of the gel does not enhance the whitening efficacy nor reduce the cytotoxicity of the treatment. Based on the knowledge acquired so far, it was possible to execute Phase 3 of the project, where a nanofibrillar scaffold (NS) and a catalytic polymeric primer (CPP) were developed. These catalytic biomaterials were used to coat the dental enamel before applying the whitening gel, which was then irradiated or not with LEDv. It was observed that the combined use of NS+CPP+LEDv increases the aesthetic efficacy of conventional in-office whitening, so the expected result can be achieved in a shorter time without causing intense cytotoxic effects on pulp cells. In Phase 4 of the project, it was determined that the strategy of irradiating (LEDv) a whitening gel applied for only 15 minutes on the enamel previously coated with NS+CPP causes only slight oxidative stress on pulp cells. Therefore, this innovative whitening strategy, which is based on the chemical catalysis/photocatalysis of H_2O_2 , not only accelerates the aesthetic result but also causes limited toxic effects on pulp cells, which exhibit low expression of inflammatory mediators and high expression of markers for mineralization.

Keywords: Tooth bleaching. Esthetics. Toxicity. Dental pulp.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 OBJETIVOS	16
3 PUBLICAÇÕES.....	17
3.1 Publicação 1	17
3.2 Publicação 2	32
3.3 Publicação 3	47
3.4 Publicação 4	64
4 INTER-RELAÇÃO ENTRE AS PUBLICAÇÕES.	81
5 CONCLUSÕES.....	84
REFERÊNCIAS	85
APÊNDICE	89

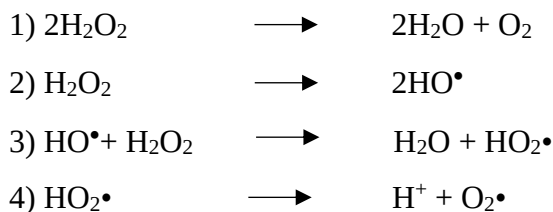
1 INTRODUÇÃO

Apesar do excelente resultado estético imediato obtido pela técnica de clareamento de consultório^{1,2}, esta modalidade de terapia tem sido questionada do ponto de vista biológico³⁻⁵. Sabe-se que géis clareadores contendo entre 30%-40% de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) na sua composição, os quais são amplamente usados na prática clínica^{6,7}, causam intenso efeito tóxico sobre células da polpa dental. Esses danos celulares são decorrentes da capacidade do H_2O_2 não reagido com as moléculas coloridas (cromóforos) presentes no dente, denominado de free- H_2O_2 , se difundir pela estrutura dental e alcançar a câmara pulpar. Quando em contato com células pulpares, elevadas concentrações de free- H_2O_2 causam intenso estresse oxidativo celular, o que resulta em peroxidação lipídica e a consequente ruptura de membranas⁸⁻¹⁰. Dependendo da espessura do esmalte e dentina, o H_2O_2 pode alcançar a polpa em concentrações suficientes para causar necrose parcial da polpa coronária, associada a inflamação e intensa deposição de dentina reacional na polpa radicular¹¹. Estes efeitos colaterais, o quais são resultantes do clareamento convencional comumente realizado em consultório, parecem estar diretamente relacionados com a ocorrência de sensibilidade dentária pós-tratamento^{6,11,12}. Vários pesquisadores demonstraram que a toxicidade celular e a efetividade estética dos protocolos atuais de clareamento dental de consultório dependem diretamente da concentração de H_2O_2 presente no gel clareador e do seu tempo de aplicação sobre o esmalte^{4,8-10,13}. Dessa maneira, alguns estudos foram realizados há alguns anos com a proposta de avaliar novos protocolos de clareamento baseados na redução da concentração de H_2O_2 nos géis e do tempo de aplicação desses produtos sobre os dentes^{4,10}. Porém, nessas pesquisas os autores observaram que os protocolos testados comprometiam o resultado estético final do procedimento, sendo que várias sessões eram necessárias para alcançar eficácia clareadora semelhante àquela já estabelecida para a terapia convencional de consultório. Diante deste fato, os protocolos clareadores testados naquele momento passaram a ser considerados como clinicamente inviáveis.

O clareamento dental caseiro, no qual géis de peróxido de carbamida (PCarb) em baixas concentrações (entre 10 e 22%) são aplicados sobre os dentes^{14,15}, parece ser uma interessante opção de terapia estética, pois pode prevenir, ou pelo menos minimizar, os efeitos colaterais causados pela técnica clareadora convencional de consultório tratamento^{6,11,12}. Quando em contato com o esmalte, os géis de PCarb liberam baixas concentrações de H_2O_2 (entre 3,0% e 7,0%), o que pode explicar o motivo desta modalidade de terapia apresentar baixos índices de sensibilidade dentária nos paciente¹⁵. Para realizar o clareamento dental caseiro, moldeiras

individuais são carregadas com gel de PCarb e então posicionadas pelos próprios pacientes nas arcadas dentárias, onde permanecem pelo período de aproximadamente 2-3 horas/dia¹⁵. Este tipo de terapia clareadora, a qual deve ser executada pelos pacientes, porém sob supervisão profissional, requer longos períodos (entre 6 e 28 dias) para se obter resultados estéticos satisfatórios¹⁵. Embora o PCarb apresente menor risco para a polpa dentária, a modalidade de clareamento caseiro se tornou preocupante, pois os produtos podem ser usados incorretamente pelos pacientes, o que pode resultar em deglutição excessiva do gel e riscos biológicos diretos para os tecidos dentais e periodontais^{16,17}. Outro fator negativo do clareamento caseiro tem sido considerado o longo tempo despendido para se obter resultado estético semelhante àquele alcançado rapidamente com o clareamento de consultório¹⁸. Diante das desvantagens das técnicas de clareamento dental caseiro e da possibilidade de danos pulpares irreversíveis e sensibilidade dental causados pelos diferentes protocolos de clareamento de consultório, diversos pesquisadores passaram a avaliar, baseados na compreensão do comportamento cinético do H_2O_2 , a adição de enzimas e óxidos metálicos catalisadores na composição de géis clareadores experimentais e de consultório^{19,20}. Os objetivos principais desses pesquisadores têm sido catalisar o H_2O_2 presente nos géis, gerando moléculas altamente reativas capazes de acelerar o clareamento dental, eliminando, ou pelo menos reduzindo, ao mesmo tempo, os efeitos tóxicos causados pela terapia clareadora convencional de consultório²⁰.

Esta nova proposta de clareamento profissional baseia-se no fato de que o H_2O_2 é uma espécie reativa derivada do oxigênio (ERO) que pode se dissociar em diferentes moléculas de acordo com as condições do ambiente onde a reação se desenvolve, seja em meio aquoso ou quando em contato com substrato orgânico^{4,10}. Além disso, a velocidade de reação e os subprodutos gerados a partir da decomposição do H_2O_2 podem ser alterados quando em contato com enzimas oxidantes^{21,22}. A reação de decomposição enzimática do H_2O_2 pode gerar oxigênio (O_2) e água (H_2O)²³, bem como radicais livres e outras EROs altamente reativas, como radicais hidroxila ($\text{HO}^\bullet$), peri-hidroxila ($\text{HO}_2^\bullet$) e superóxido ($\text{O}_2^\bullet$), tal como demonstrado a seguir^{24,25}:



Dentre as diversas EROs conhecidas, o $\text{HO}^\bullet$ é aquela que apresenta o maior potencial reativo com substratos orgânicos, o que parece proporcionar uma rápida fragmentação dos

cromóforos presentes nos tecidos duros dos dentes escurecidos^{16,26,27}. Por serem consideradas moléculas de natureza simples, as EROs derivadas de H_2O_2 apresentam curto tempo de meia-vida, o que faz com que sejam rapidamente eliminadas do meio^{4,10}. Dentre as EROs geradas à partir da degradação do H_2O_2 , o $\text{HO}^\bullet$ é aquela que apresenta o menor tempo de meia-vida (10^{-9} seg) e o maior potencial de oxidação ($E_o = +2,8\text{V}$)²⁴. Assim, considerando todos esses dados científicos, foi possível estabelecer a hipótese de que quanto maior a degradação do H_2O_2 presente nos géis clareadores, mais moléculas altamente reativas são geradas, o que pode fazer com que o clareamento ocorra mais rapidamente. A degradação do H_2O_2 também pode diminuir a quantidade de free- H_2O_2 no esmalte e dentina, limitando a chegada de elevada quantidade desta molécula tóxica na polpa. Como as EROs e radicais livres gerados pela degradação do H_2O_2 tem reduzido tempo de meia-vida, estas moléculas podem ser rapidamente decompostas logo após interagirem com os cromóforos e outros componentes orgânicos presentes na dentina, o que seria importante para tornar o clareamento dentário de consultório uma terapia mais segura e biocompatível com o complexo dentina-polpa.

Recentemente, Ortecho-Zuta et al.¹⁹ demonstraram que a adição de 10 mg/mL da enzima peroxidase hêmica (HRP) ao gel clareador com 35% de H_2O_2 reduz significativamente a citotoxicidade trans-amelodentinária do produto. Nesse estudo, a presença da HRP no gel fez com que a viabilidade celular fosse cerca de 34% maior quando comparada ao gel que não recebeu a adição da enzima. Além disso, os autores observaram que o gel contendo HRP aumentou em aproximadamente 24% a eficácia estética após a 1ª sessão de clareamento. Consequentemente, o fato da catálise enzimática do H_2O_2 resultar na formação de EROs e radicais livres mais potentes e com menor tempo de meia-vida em comparação ao próprio H_2O_2 , pode direcionar o desenvolvimento de terapias clareadoras mais rápidas e biologicamente seguras para os pacientes^{20,28,29}. Porém, apesar dos efeitos positivos sobre a eficácia clareadora e redução da toxicidade celular, observados quando um agente catalizador foi adicionado ao gel clareador de consultório, esse último benefício foi limitado, visto que as células pulpares ainda se apresentaram sensíveis ao estresse oxidativo mediado pelo free- H_2O_2 ¹⁹. Assim, talvez outras estratégias para catalisar o H_2O_2 , tal como o recobrimento do esmalte com uma fita semi-permeável orgânica associada a um primer contendo algum agente catalizador químico, previamente à aplicação do gel clareador, possam direcionar protocolos ainda mais seguros para o clareamento de consultório. Porém, seria importante que polímeros com estrutura física e componentes orgânicos específicos fossem usados na confecção da fita, de tal forma que este novo biomaterial pudesse gerar, a partir da decomposição do H_2O_2 , moléculas altamente reativas, limitando a difusão trans-amelodentinária de free- H_2O_2 .

As indústrias farmacêutica e química têm utilizado diversos polímeros orgânicos para formular biomateriais empregados no campo da engenharia tecidual (Santoro et al., 2016). Dentre estes polímeros, destaca-se a poli-caprolactona (PCL), a qual é biocompatível, biodegradável e atóxica³⁰⁻³². A partir de uma solução à base de PCL, podem ser desenvolvidas, por meio da técnica de electrospinning, fitas poliméricas compostas por fibras com diâmetro em escala que varia de nano a micrométrica¹⁹. Ainda, empregando parâmetros específicos proporcionados por essa técnica laboratorial, é possível controlar a morfologia e os espaços interfibrilares, obtendo dessa forma a porosidade desejada do biomaterial, de acordo com sua finalidade de aplicação clínica^{32,33}. Assim, PCL parece ser um polímero orgânico adequado para o desenvolvimento de fitas poliméricas a serem empregadas para revestir o esmalte dentário antes da aplicação de géis clareadores com elevada concentração de H_2O_2 . Para preparação do primer catalisador contendo a enzima HRP, poderá ser usado o hidroxipropil metilcelulose (HPMC), o qual além de ser um polímero atóxico, origina uma película resistente ao escoamento e que permite a incorporação de drogas, nanopartículas, peptídeos e proteínas. Avaliações preliminares realizadas no Laboratório de Patologia Experimental e Biomateriais (LPEB) da FOAr./UNESP, mostraram que dentre os diversos polímeros testados, o HPMC foi aquele que apresentou as melhores propriedades para ser usado na preparação de primers associados à enzimas catalizadoras. Assim, espera-se que o emprego desta estratégia, a qual é baseada no conhecimento de química orgânica aplicada à biotecnologia de materiais, reduza a quantidade de H_2O_2 capaz de alcançar a fita polimérica para interagir com seu componente orgânico. Desta forma, esta barreira protetora experimental, composta pelo primer catalisador e fita polimérica, pode fazer com que uma limitada quantidade de H_2O_2 alcance o esmalte e dentina. Considerando que as EROs e radicais livres gerados pela decomposição do H_2O_2 apresentam elevado potencial oxidativo e reduzido tempo de meia-vida, espera-se que o clareamento dental seja acelerado, sem causar danos significativos para as células pulpares. Porém, sabendo que a geração destas moléculas altamente reativas à partir da degradação de H_2O_2 também pode ser aumentada pela fotocatalise, parece interessante irradiar o gel clareador com um tipo e parâmetro específico de luz, imediatamente após sua aplicação sobre a barreira protetora.

Com base no fato de que a irradiação de géis clareadores pode ser considerada uma interessante estratégia para terapias clareadoras de consultório, pesquisadores passaram a avaliar diferentes fontes luminosas, como diodos emissores de luz (LED) azul, LED violeta, laser, luz halógena e outras^{6,34-36}. O uso de luz na terapia clareadora se fundamenta na capacidade de absorção de energia pelo gel clareador, o que produz calor e acelera a oxidação

do H_2O_2 , aumentando a liberação de EROs³⁷. Klaric, et al.³⁴ demonstraram que dentre as diversas as fontes de luz testadas, o LED violeta, o qual possui comprimento de onda de 405-410 nm, foi aquele que produziu os melhores resultados estéticos quando aplicado sobre géis clareadores. Sabe-se que a emissão de luz na faixa violeta coincide com o máximo de absorção das grandes moléculas orgânicas pigmentadas, o que resulta na sua fragmentação e a consequente geração de pequenas estruturas moleculares sem cor³⁵. Porém, por ser uma alternativa relativamente recente, estudos sobre a real eficácia clareadora da luz violeta, associada ou não a géis clareadores, bem como seus possíveis efeitos colaterais, vem sendo realizados nos últimos anos³⁸⁻⁴². Pesquisadores demonstraram que um gel clareador com 17,5% de H_2O_2 , aplicado por 45 minutos sobre o esmalte, teve sua eficácia estética aumentada quando catalisado com luz violeta^{39,40}. Do mesmo modo, ensaios clínicos mostraram que a irradiação do gel clareador com LED violeta favorece a eficácia estética da terapia^{40,42}. Apesar desta fonte de luz aumentar o limiar de detecção de alteração térmica nos dentes irradiados, não foi observado qualquer elevação na sensibilidade dentária pós-tratamento clareador com LED violeta⁴⁰. A despeito dos interessantes resultados já alcançados por meio do uso do LED violeta no clareamento dental, não há informações científicas robustas que determinem o emprego seguro desta tecnologia, associada ou não a géis clareadores com diferentes concentrações de H_2O_2 e aplicados por variados períodos sobre o esmalte dentário.

Levando em consideração os dados científicos apresentados até o momento e baseado no notável conhecimento adquirido na última década com o desenvolvimento de pesquisas inovadoras na área de alteração cromática dos tecidos dentários e seus possíveis efeitos adversos, o presente estudo foi desenvolvido. Inicialmente, foi proposto determinar a influência de moléculas coloridas (cromóforos) de diferentes origens, as quais causam o escurecimento dos dentes, sobre a difusão trans-amelodentinária de H_2O_2 . A partir da padronização da cor dos tecidos dentários com um mesmo cromóforo, foi avaliado se o tempo de irradiação de um gel clareador de consultório com LED violeta pode favorecer o resultado estético do procedimento e ao mesmo tempo reduzir sua citotoxicidade. Na sequência, com a intenção de acelerar a catálise do H_2O_2 , gerando moléculas com maior potencial para decompor cromóforos, o LED violeta foi usado em conjunto com um scaffold de nanofibras e um primer polimérico contendo 10 mg/mL da enzima peroxidase hêmica. Foi avaliado a capacidade desta combinação de estratégias de catálise do H_2O_2 em reduzir o tempo para alcançar excelente resultado estético e prevenir os efeitos citotóxicos característicos do clareamento convencional de consultório.

2 OBJETIVOS

- Publicação 1: Avaliar se os cromóforos de diferentes origens, ou mesmo uma combinação deles, pode influenciar o efeito tóxico indireto de géis usados no clareamento dental de consultório. Então, o objetivo do presente estudo foi avaliar a influência de diferentes soluções de manchamento (café, chá preto, vinho e uma combinação delas) sobre a citotoxicidade trans-amelodentinária de géis clareadores contendo 35% de H_2O_2 ;
- Publicação 2: Avaliar se o aumento no tempo de irradiação de um gel clareador comercial de consultório (35% de H_2O_2) com o LED Violeta pode favorecer a eficácia estética e diminuir a citotoxicidade trans-amelodentinária deste tipo de terapia profissional;
- Publicação 3: Avaliar a influência do uso conjunto de um scaffold de nanofibras (SN), um primer polimérico catalisador (PPC) contendo 10 mg/mL da enzima peroxidase hêmica e do LED violeta (LEDv) sobre a eficácia estética (EE), citotoxicidade trans-amelodentinária (CT) e possível redução no tempo para executar o clareamento dental de consultório;
- Publicação 4: Após selecionar o melhor tempo de aplicação da estratégia clareadora inovadora, será avaliada a sua citocompatibilidade em modelo de cultura 3D de células pulpaes humanas.

3 PUBLICAÇÕES

Nos próximos tópicos serão apresentados os resultados do presente estudo em formato de publicações.

3.1 Publicação 1*

Pigmentos de diferentes origens podem interferir na citotoxicidade causada pelo clareamento de consultório?

RESUMO

Objetivo: Avaliar a influência do manchamento dentário, realizado com diferentes soluções coloridas, sobre a citotoxicidade de um gel clareador com 35% H_2O_2 .

Materiais e Métodos: Os seguintes grupos foram estabelecidos: CN– sem tratamento (controle negativo); CP–35% H_2O_2 (controle positivo); CA H_2O_2 – café+35% H_2O_2 ; CH– chá preto+35% H_2O_2 , VI– vinho+35% H_2O_2 ; CACHVI– café/chá preto/vinho+35% H_2O_2 . Discos de esmalte/dentina (n=8) padronizados foram manchados e tiveram a alteração de cor avaliada (ΔWI) antes e após o clareamento (RM-ANOVA/Sidak; $p < 0,05$). Discos também foram adaptados em câmaras pulpares artificiais (n=8), sendo que após concluir o clareamento, os extratos (meio de cultura + componentes do gel difundidos) foram coletados e aplicados sobre células odontoblastóides. A quantidade de H_2O_2 difundido, bem como a viabilidade e estresse oxidativo celular foram avaliados (ANOVA/Tukey; $p < 0,05$).

Resultados: Todas as soluções coloridas foram eficazes no manchamento dos discos (CA; CH; VI; e CACHVI), sem diferença significativa entre elas ($p > 0,05$). Todos os protocolos de manchamento reduziram, sem diferença entre eles, a difusão trans-amelodentinária de H_2O_2 ($p > 0,05$), o que diminuiu a citotoxicidade da terapia clareadora em comparação ao CP ($p < 0,05$).

Conclusão: Independente das soluções coloridas usadas no manchamento do esmalte e dentina, a presença de pigmentos de diferentes origens nos substratos dentários reduziu, de maneira semelhante, a citotoxicidade de um gel clareador com 35% H_2O_2 .

Relevância clínica: Pigmentos presentes nos dentes, provenientes de café, chá preto, vinho ou de uma combinação deles, reduzem a difusão de H_2O_2 pelo esmalte e dentina, o que diminui os efeitos citotóxicos do clareamento dental de consultório

* Artigo formatado segundo as normas de publicação do periódico *Odontology* para o qual foi submetido.

INTRODUÇÃO

Muitas pessoas têm relatado insatisfação com sua aparência, sendo que este sentimento está principalmente relacionado com a cor de seus dentes (1). Dentro desse contexto, foi demonstrado que o clareamento dentário é capaz de impactar a qualidade de vida dos indivíduos, cuja percepção estética positiva de seus dentes reduz o desconforto e favorece sua autoconfiança (2).

Quando comparado aos diferentes tratamentos atualmente usados para alterar a cor do substrato dentário, o clareamento dental de consultório se destaca por ser uma técnica não invasiva, a qual é realizada de forma rápida, através da aplicação de géis contendo elevadas concentrações de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) sobre os dentes escurecidos (3,4). No processo de clareamento dental, o H_2O_2 - espécie reativa derivada do oxigênio (EROs), bem como alguns radicais livres gerados por sua degradação, penetram o esmalte e dentina, onde quebram moléculas coloridas grandes (cromóforos), tornando-as menores e mais simples. Esse fenômeno resulta na modificação da reflexão do comprimento de onda da luz e, conseqüentemente, altera a percepção de cor dos elementos dentários (5-8).

De maneira geral, a cor dos dentes é determinada pela presença e quantidade de cromóforos que se acumulam na superfície ou no interior do esmalte e/ou dentina (9). Com objetivo de avaliar a alteração de cor causada por géis contendo variadas concentrações de H_2O_2 , e também de diferentes terapias de clareamento dental, pesquisadores têm buscado reproduzir, em laboratório, condições clínicas de dentes escurecidos. Para alcançar este objetivo, amostras padronizadas (discos ou blocos de esmalte/dentina) são imersas em soluções com alta quantidade de cromóforos, como chá preto, vinho e/ou café (10-22). Apesar dos inúmeros protocolos de manchamento e de soluções (naturais ou artificiais) empregadas para a realização de estudos de clareamento dental in vitro e/ou in situ, os resultados dessas pesquisas têm mostrado que o tipo de solução utilizada não influencia no resultado estético causado por uma mesma terapia clareadora (16,20). Dessa forma, é possível supor que os géis clareadores têm ampla e efetiva ação sobre cromóforos de diferentes origens. Porém, num estudo recente, foi demonstrado que a presença de cromóforos nos tecidos dentários interfere no grau de citotoxicidade do procedimento clareador (15). Neste estudo, foi observado que um protocolo específico de clareamento dental de consultório, quando realizado sobre amostras de esmalte/dentina não previamente manchadas, causava maior efeito tóxico sobre células pulpares em comparação com amostras manchadas com chá preto. Os autores relataram que a interação entre os cromóforos e o H_2O_2 proveniente do gel clareador, degradaria parte dessa

molécula tóxica, fazendo que reduzida quantidade dela ($\text{H}_2\text{O}_2\text{-free}$) viesse permanecer no interior das amostras. Desta maneira, uma menor quantidade de $\text{H}_2\text{O}_2\text{-free}$ conseguiria se difundir pelo esmalte e/ou dentina para causar toxicidade para células da polpa dentária.

Embora a presença de cromóforos não afete o resultado estético da terapia, a padronização dos protocolos de manchamento parece ser fundamental para conduzir, com segurança, ensaios de citotoxicidade de géis clareadores, bem como fazer a correta comparação entre produtos e terapias (23-29). Assim, torna-se relevante, neste momento, avaliar se os cromóforos de diferentes origens, ou mesmo uma combinação deles, pode influenciar o efeito tóxico indireto de géis usados no clareamento dental de consultório. Então, o objetivo do presente estudo foi avaliar a influência de diferentes soluções de manchamento (café, chá preto, vinho e uma combinação delas) sobre a citotoxicidade trans-amelodentinária de géis clareadores contendo 35% de H_2O_2 . A hipótese nula testada foi:

- As diferentes soluções de manchamento não reduzem a citotoxicidade trans-amelodentinária causada por um gel clareador de consultório aplicado por 45 min sobre o esmalte.

MATERIAIS E MÉTODOS

1.1 Cálculo do tamanho da amostra: O número de réplicas biológicas para as variáveis de resposta "eficácia estética" e "citotoxicidade" foi calculado usando o software G*Power (versão 3.1; University Dusseldorf, Dusseldorf, Alemanha). O poder do teste (probabilidade de erro $1-\beta$) e probabilidade de erro α foram 0,80 e 0,05, respectivamente. O tamanho do efeito para eficácia estética foi de 4,03 e a citotoxicidade trans-amelodentinária foi de 3,35. O tamanho estimado da amostra de 8 espécimes/grupo foi definido para todas as variáveis de resposta. Cada protocolo foi conduzido em dois experimentos separados (duplicatas) para minimizar erros sistemáticos e permitem a reprodutibilidade da observação.

1.2 Obtenção e padronização dos discos de esmalte e dentina: Noventa e seis discos de esmalte/dentina padronizados (5,6 mm de diâmetro) foram obtidos de incisivos bovinos íntegros, por meio do uso de uma broca diamantada do tipo trefina (Dinser brocas diamantadas Ltda., São Paulo, SP, Brasil) acoplada a uma furadeira de bancada (FSB 16 Pratika, Schül tz, Joinville, SC, Brasil). 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 até obter-se espessura padronizada de 2,3 mm de esmalte/dentina simulando a espessura de incisivos inferiores (10-13).

1.3 Avaliação da eficácia estética (n=8): Discos de esmalte/dentina foram submetidos ao procedimento laboratorial de manchamento durante 24 horas com café (Café Solúvel – Nescafé), chá preto (Chá Preto – Chá Leão), vinho tinto (Vinho Chileno Reservado Cabernet Sauvignon – Concha y Toro) ou o blend das soluções e então distribuídos em grupos (Tabela 1). Os discos foram expostos a 1 mL de cada solução por 24 horas, em seguida foi realizada uma profilaxia com pedra-pomes e água para remoção dos pigmentos superficiais não aderidos. Amostras foram mantidas em algodão + solução tipo saliva (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) (30) em contato com o esmalte e algodão + água em contato com a dentina por 72 horas e posteriormente foi realizada a leitura de cor pós manchamento. Em seguida, o gel clareador foi aplicado de acordo com as recomendações do fabricante (Whiteness HP – FGM Dental Group, Joinville, SC, Brasil). Com os discos posicionados numa matriz de silicone branco, procedeu-se a análise da eficácia clareadora por meio de um espectrofotômetro de reflexão UV (Espectrofotômetro de Reflexão ML Color Guide, BYK Gardner GmbH Geretsried, Alemanha). Com os valores de $L^*a^*b^*$ obtidos antes (*baseline*) e 72 horas após concluir os procedimentos clareadores, foi possível calcular a alteração de cor usando as seguintes equações:

Equação do CIEDE2000

$$\sqrt{\left(\frac{\Delta L'}{k_L S_L}\right)^2 + \left(\frac{\Delta C'}{k_C S_C}\right)^2 + \left(\frac{\Delta H'}{k_H S_H}\right)^2} + R_T \frac{\Delta C'}{k_C S_C} \frac{\Delta H'}{k_H S_H}$$

Equação do Índice de Clareamento

$$1) \text{ WI} = 0,511L^* - 2,3424a^* - 1,100b^*$$

$$2) \Delta \text{WI} = \text{WI}_{\text{afterbleaching}} - \text{WI}_{\text{baseline}}$$

Tabela 1. Distribuição dos grupos controle e experimentais, de acordo com os produtos usados para proceder o manchamento das amostras, pH e protocolo clareador usado.

GRUPOS	MANCHAMENTO	pH	PROTOCOLO CLAREADOR
CN	-	-	Nenhum tratamento clareador foi realizado
CP	-	-	Gel comercial contendo 35% de H ₂ O ₂ aplicado por 45 min.
CA	Café	4.8	Gel comercial contendo 35% de H ₂ O ₂ aplicado por 45 min.
CH	Chá Preto	5.1	Gel comercial contendo 35% de H ₂ O ₂ aplicado por 45 min.
VI	Vinho	3.4	Gel comercial contendo 35% de H ₂ O ₂ aplicado por 45 min.
CACHVI	Café + Chá Preto + Vinho	5.0	Gel comercial contendo 35% de H ₂ O ₂ aplicado por 45 min.

2 Citotoxicidade trans-amelodentinária

2.1 Cultura de Células MDPC-23: Células imortalizadas de linhagem odontoblástica MDPC-23 foram cultivadas em placas esterilizadas de 75 cm² (KASVI Imp., Curitiba, PR, Brasil), usando para isso meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; GIBCO. Grand Island, NY, EUA) contendo 10% de soro fetal bovino (SFB; GIBCO), 100 IU/mL e 100 µg/mL, respectivamente de penicilina e estreptomicina e 2 mmol/L de glutamina (GIBCO) em uma atmosfera umedecida a 37°C, com 5% de CO₂ e 95% de ar. As células foram submetidas a passagens até obter o número adequado para realização do experimento.

2.2 Procedimento Experimental: Discos de esmalte/dentina foram adaptados em câmaras pulpares artificiais (CPAs), sendo os conjuntos discos/CPAs esterilizados em óxido de etileno (Acecil, Central de Esterilização Comércio e Indústria LTDA, Campinas, SP, Brasil). Então, cada conjunto foi individualmente posicionado no compartimento de placas de acrílico esterilizadas de 24 compartimentos (KASVI Imp.) contendo 1 mL de DMEM (10-13). Imediatamente após realizar o procedimento clareador sobre o esmalte, os extratos (DMEM + componentes dos géis clareadores que se difundiram pelos discos de esmalte/dentina) foram coletados e usados nos testes de citotoxicidade.

2.3 Quantificação do H₂O₂ nos extratos (n=8): Alíquotas de 100 µL dos extratos obtidos de cada grupo foram transferidas para tubos plásticos de 5 mL (KASVI Imp.) contendo 900 µL de solução tampão acetato (2 mol/L; pH 4,5), o qual permite a estabilização do H₂O₂. Em seguida, 500 µL desta solução foi transferido para novos tubos plásticos de 5 mL (KASVI Imp.) contendo água e corante violeta leucocrystal (0,5 mg/mL, Sigma-Aldrich). Os tubos foram

agitados em vortex e 50 μ L de solução de 1 mg/mL da enzima horseradish peroxidase (Sigma-Aldrich) foi adicionada. A absorbância das soluções foi medida em espectrofotômetro (Synergy H1) com comprimento de onda de 596 nm. A curva padrão de quantidades conhecidas de H_2O_2 foi utilizada para a conversão dos valores de densidade óptica obtidos das amostras em μ g de H_2O_2 por mL de extrato (10-13).

2.4 Avaliação da viabilidade celular (Teste de alamarBlue, n=8; Live/Dead, n=4): Alíquotas de 100 μ L de cada extrato foram aplicadas sobre células MDPC-23 previamente cultivadas (10.000 células) em compartimentos de placas de acrílico esterilizadas de 96 compartimentos (KASVI Imp.). Após 1 h de incubação, os extratos foram aspirados e as células que permanecerem aderidas ao fundo dos compartimentos foram incubadas por 4 hs em contato uma solução composta por 90 μ L de DMEM e 10 μ L da solução Alamar Blue (Life Technologies; Grand Island, NY, EUA). Então, a solução foi coletada e transferida para uma placa de 96 compartimentos (KASVI Imp.), sendo a absorbância mensurada a 570 nm em espectrofotômetro (Synergy H1, Biotek, Winooski, EUA) (10-13). O ensaio foi realizado com o kit Live/Dead Cell Viability/Cytotoxicity (Invitrogen, San Francisco, CA, EUA) (n=4), que utiliza a sonda de fluorescência Ethyl homodimer-1 (Eth-1) que se liga a bandas de DNA apenas em células com ruptura da membrana celular (vermelho). A segunda sonda foi a Calcein AM (CA), que é hidrolisada por esterases citoplasmáticas em células viáveis (verde) (11).

2.5 Análise do estresse oxidativo celular (n=8): O estresse oxidativo celular foi avaliado por meio da estimativa da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) pelas células imediatamente após o clareamento. Para isto, células MDPC-23 previamente cultivadas em compartimentos de placas esterilizadas de 96 compartimentos foram expostas por 30 min à sonda carboxy-H2DCFDA (Invitrogen) na concentração de 10 μ g/mL. Esta sonda é permeável à membrana celular e emite fluorescência quando em contato com EROs. Na sequência, alíquotas de 100 μ L dos extratos de cada grupo foram aplicadas sobre as células por 1 h e a intensidade de fluorescência avaliada a 592 nm excitação e 517 nm emissão (Synergy H1) após o período de exposição aos extratos. Os dados foram normalizados pelo grupo controle negativo, tal como previamente descrito (10-13).

3 Análise estatística: Os dados coletados foram submetidos ao teste de Shapiro-Wilk para avaliação da normalidade e ao teste de Levene para avaliação da homoscedasticidade. Para o ensaio de eficácia estética, foi realizada análise de variâncias com medidas repetidas (RM-ANOVA), seguido do pós teste de Sidak, considerando a análise das mesmas amostras antes do manchamento e depois do clareamento. Os dados de viabilidade celular, estresse oxidativo e

difusão de H_2O_2 foi realizada análise de variâncias a um critério (One Way ANOVA), seguido do pós teste de Tukey, considerando apenas a solução de manchamento como fator. Todas as análises estatísticas realizadas empregaram um nível de significância de 5% (IBM SPSS Statistics for Windows, Version 25.0, Armonk, NY).

RESULTADOS

Eficácia estética: Todas as soluções de coloração (CA, CH, VI e CACHVI) alteraram significativamente a cor (ΔE_{00}) e o índice de clareamento (ΔWI_D) dos discos de esmalte/dentina em comparação com CN e CP ($p < 0,05$) (Tabela 2). O ΔWI_D das soluções de manchamento apresentou valores negativos, indicando escurecimento dos discos de esmalte/dentina após os protocolos. A aplicação de gel clareador de H_2O_2 a 35% por 45 minutos no esmalte promoveu uma intensa degradação dos cromóforos em CA, CH, VI e CACHVI, sem diferença estatística entre os protocolos para ambas as equações ($p > 0,05$) (Tabela 2). Além disso, no grupo CP, no qual nenhum protocolo de manchamento foi realizado, mas o clareamento foi realizado, uma mudança significativa na cor (ΔE_{00}) e no índice de clareamento (ΔWI_D) foi observada em comparação com CN ($p < 0,05$). No entanto, CP promoveu valores intermediários de ΔE_{00} e ΔWI_D , inferiores aos grupos manchados ($p < 0,05$) (Tabela 2).

Tabela 2. Média (desvio padrão) dos valores de ΔE_{00} e ΔWI_D após a coloração e após o clareamento. Letras maiúsculas distintas indicam diferenças estatísticas para o mesmo grupo ao longo do tempo, e letras minúsculas diferentes indicam diferenças estatísticas entre os grupos no mesmo período ($n=8$; RM-ANOVA/Sidak=5%).

Grupos	Pós manchamento		Pós clareamento	
	ΔE_{00}	ΔWI_D	ΔE_{00}	ΔWI_D
CN	0,2 (0,4) ^{A,a}	-0,2 (1,1) ^{A,a}	0,3 (1,3) ^{A,c}	-0,1 (0,9) ^{A,c}
CP	4,1 (0,3) ^{A,a}	2,8 (0,6) ^{A,a}	8,6 (1,6) ^{B,b}	9,8 (1,1) ^{B,b}
CA	1,2 (0,8) ^{A,b}	-1,3 (1,4) ^{A,b}	12,4 (2,1) ^{B,a}	15,6 (0,9) ^{B,a}
CH	1,4 (1,1) ^{A,b}	-1,4 (0,9) ^{A,b}	13,2 (1,2) ^{B,a}	15,2 (0,7) ^{B,a}
VI	1,6 (2,1) ^{A,b}	-1,4 (1,0) ^{A,b}	11,9 (0,9) ^{B,a}	15,5 (0,8) ^{B,a}
CACHVI	1,3 (1,6) ^{A,b}	-1,6 (0,4) ^{A,b}	12,9 (0,7) ^{B,a}	15,6 (1,6) ^{B,a}

Quantificação do H_2O_2 nos extratos: Os resultados encontrados nessa análise estão expostos na Figura 2. A presença de pigmento nas amostras, independente da solução de manchamento utilizada, reduziu a quantidade de H_2O_2 capaz de se difundir pelo esmalte/dentina para alcançar o espaço pulpar. O maior valor de H_2O_2 difundido pelos discos de esmalte/dentina foi observado no CP, onde a terapia clareadora foi aplicada em amostras não previamente manchadas ($p < 0,05$).

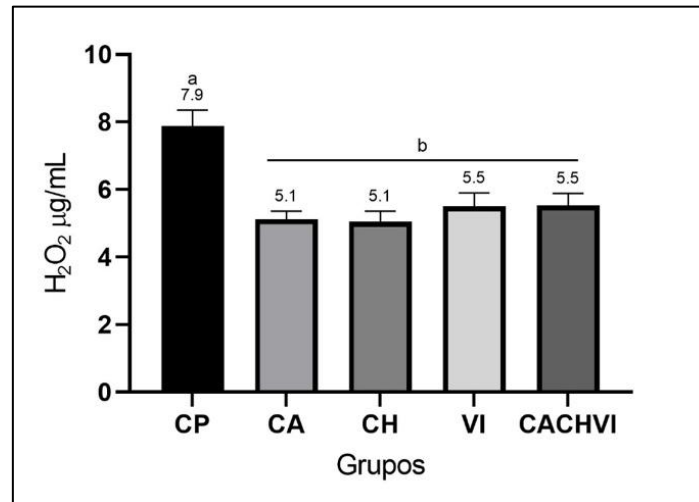


Figura 2. Análise da quantidade de H₂O₂ difundido pelos discos de esmalte/dentina. Barras representam valores médios e desvio-padrão. Números demonstram a média de cada grupo. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes (n=8; ANOVA/Tukey =5%).

Viabilidade celular: Tal como observado na Figura 3A, diminuição da viabilidade celular ocorreu em todos os grupos clareados (CP, CA; CH; VI; e CACHVI), quando comparados ao CN (p<0,05), o que demonstra o intenso potencial citotóxico de géis clareadores com 35% de H₂O₂, mesmo quando aplicados em numa única sessão de 45 min. As células no CP apresentaram o menor valor de viabilidade quando comparado aos grupos CA, CH, VI, e CACHVI, onde as amostras foram manchadas previamente ao tratamento clareador (p<0,05). O ensaio de Live/Dead mostrou que as células de todos os grupos clareados (CP, CA; CH; VI; e CACHVI) tiveram aumento na marcação positiva para EthD-1 (vermelho) em comparação ao grupo CN (Figura 3B). Apesar disso, uma maior quantidade de células aderida ao fundo da placa foi observado em CA, CH, VI e CACHVI, quando comparados a CP.

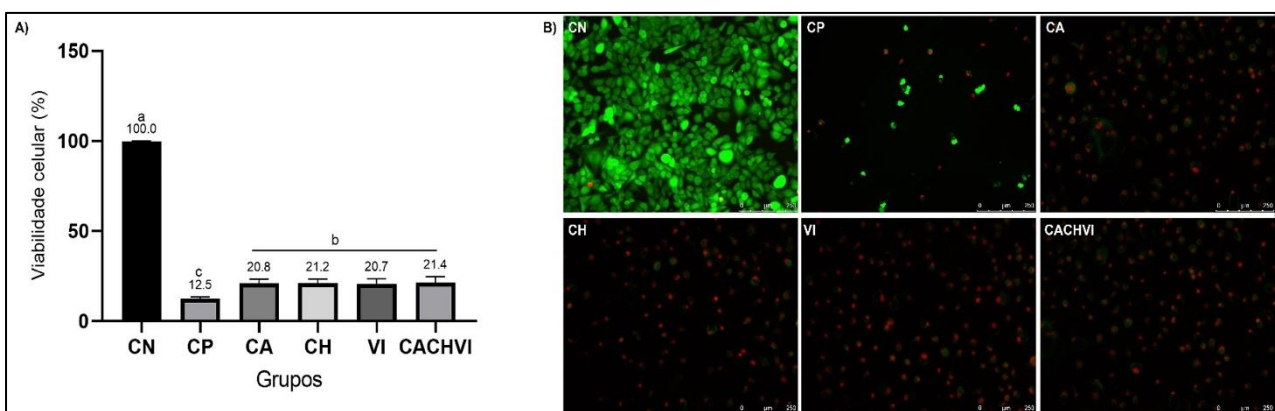


Figura 3. A - Análise da viabilidade celular. Barras representam valores médios e desvio-padrão. Números demonstram a média de cada grupo. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes (n=8; ANOVA/Tukey. =5%). B - Imagens da microscopia de fluorescência do ensaio de Live/Dead (10x). Nas imagens de microscopia as células coradas em verde (Calcein AM) se apresentam viáveis e as células coradas em vermelho (EthD-1) se apresentam em processo de morte celular.

Estresse oxidativo celular: Em todos os grupos clareados (CP, CA; CH; VI; e CACHVI), houve aumento significativo do estresse oxidativo quando comparado ao CN ($p<0,05$). Porém, foi observado que a presença de pigmento nas amostras, independente da solução de manchamento usada, reduziu a intensidade do estresse oxidativo celular quando comparado ao CP ($p<0,05$).

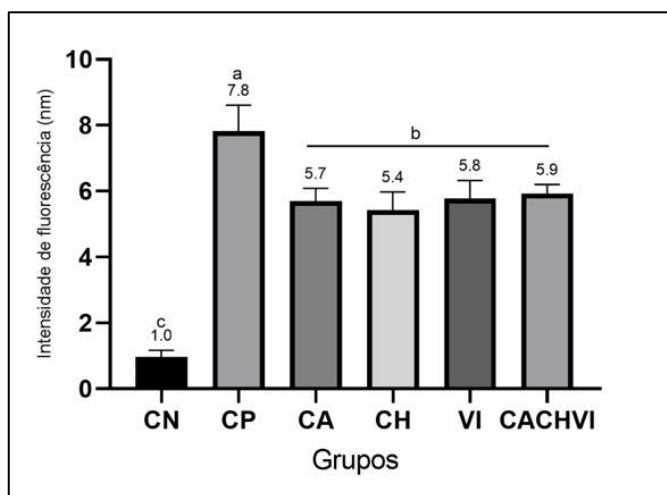


Figura 4. Análise de estresse oxidativo. Barras representam valores médios e desvio-padrão. Números demonstram a média de cada grupo. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes ($n=8$; ANOVA/Tukey, $\alpha=5\%$).

DISCUSSÃO

Para avaliar e comparar, *in vitro*, a citotoxicidade trans-amelodentinária de diferentes produtos e terapias clareadoras, o manchamento padronizado de dentes ou discos de esmalte/dentina tem sido considerado um passo fundamental para assegurar a confiabilidade dos resultados (15). No presente estudo, foi demonstrado que todas as soluções usadas para realizar o manchamento dos discos de esmalte/dentina foram eficazes no processo de alteração de cor das amostras. A terapia clareadora usada foi capaz de degradar os cromóforos, independente dos protocolos de manchamento testados, os quais limitaram, de maneira semelhante, a difusão trans-amelodentinária de H_2O_2 . Consequentemente, a redução da citotoxicidade indireta causada pelo gel clareador de consultório com 35% H_2O_2 foi similar entre os grupos CA, CH, VI, e CACHVI, onde os discos de esmalte/dentina foram manchados com café, chá preto, vinho ou uma combinação deles, respectivamente. Diante desses dados, a hipótese nula estabelecida no presente estudo foi recusada, visto que todos os protocolos de manchamento testados diminuíram a citotoxicidade trans-amelodentinária causada por um gel clareador com 35% H_2O_2 , o qual foi aplicado por 45 min sobre o esmalte.

A coloração dental artificial realizada em laboratório é um método desenvolvido para simular alterações na cor dos dentes, as quais ocorrem naturalmente ao longo da vida das pessoas devido ao acúmulo de cromóforos, bem como deposição contínua de dentina secundária e/ou formação de dentina terciária (16,19). Os protocolos de manchamento descritos na literatura têm sido amplamente utilizados em diversas pesquisas *in vitro* como uma tentativa de estabelecer substratos homogêneos que permitam avaliar e comparar os efeitos de diferentes produtos e terapias clareadoras. Num estudo de regressão múltipla e análise logística, Rezende et al. (2016) (4) estabeleceram a hipótese de que a cor inicial do dente poderia, de alguma forma, prever a possível sensibilidade pós clareamento dental. Dentro deste contexto, foi sugerido que quanto mais escuros os dentes, menor a intensidade e risco de sensibilidade dentária. Isto seria explicado pelo fato de que substratos dentários mais escuros apresentam maior conteúdo orgânico, tal como de moléculas coloridas, as quais são capazes de interagir com o H_2O_2 liberado dos géis clareadores. Consequentemente, uma menor quantidade de H_2O_2 não reagido estaria disponível para causar lesão pulpar associada com a ocorrência de sensibilidade dentária, a qual é comumente relatada pela maioria dos pacientes submetida a este tipo de tratamento estético (4,23,24). A teoria proposta por Rezende et al. (2016) (4) foi inicialmente comprovada pelo estudo de Duque et al. (2020) (16), onde os autores mostraram que a presença de moléculas orgânicas coloridas (cromóforos) em discos de esmalte/dentina interferiu na difusão de H_2O_2 -free por estes tecidos, o que resultou em menor efeito tóxico para células pulpares. Porém, uma importante limitação do estudo de Duque et al. (2020) (16) é que as amostras foram manchadas apenas com chá preto. No presente estudo, além de chá preto, os discos de esmalte/dentina também foram manchados com café, vinho e uma combinação destas três soluções. Independente do protocolo de manchamento usado, foi observado menor difusão de H_2O_2 nas amostras pigmentadas (cor inicial mais escura) do que nas amostras não manchadas (cor inicial mais clara), o que corrobora com os dados obtidos previamente por Duque et al. (2020) (16).

Já foi demonstrado que minerais presentes na saliva podem favorecer o processo de remineralização do esmalte, bem como proteger esse tecido contra erosão (14,21). Porém, numa investigação laboratorial recente, da Silva et al. (2022) (22) não mantiveram o esmalte em contato com uma solução semelhante à saliva após realizar os protocolos de manhamento das amostras. Neste estudo, os autores colocaram as amostras por longo período em contato com soluções coloridas ácidas, o que reduziu a microdureza do esmalte e aumentou sua rugosidade superficial (14,16). Esses efeitos causados pela exposição do esmalte às soluções com baixo pH podem facilitar a difusão trans-amelodentinária de H_2O_2 e assim aumentar os efeitos citotóxicos

de produtos clareadores e terapias experimentais. No presente estudo, as soluções coloridas de chá preto, café, vinho e uma mistura delas, usadas para manchamento das amostras, apresentaram valores de pH que variaram de 3,4 até 5,0. Assim, para evitar algum viés metodológico e com o objetivo de simular a situação clínica fisiológica, onde o esmalte dos dentes permanece em contato com saliva na cavidade oral, o esmalte das amostras usadas neste estudo foi mantido em contato uma solução semelhante a saliva por 72 horas após a realização dos protocolos de manchamento. A microdureza e a rugosidade do esmalte antes e após o manchamento e o clareamento das amostras não foram avaliadas neste estudo. Porém, a significativa redução na difusão trans-amelodentinária de H_2O_2 e da citotoxicidade da terapia clareadora usada neste estudo, também pode ter sido parcialmente influenciada pelo contato do esmalte com uma solução semelhante à saliva, a qual contribui para deposição local de minerais (21).

Em todos os grupos onde foi realizado o manchamento das amostras antes de proceder a sessão clareadora de 45 min (CA; CH; VI; e CACHVI), ocorreu redução na difusão trans-amelodentinária de H_2O_2 , com a consequente diminuição do estresse oxidativo celular. Sulieman (2003) (19) relatou que a matriz inorgânica dos cromóforos faz com que eles fiquem retidos dentro da estrutura cristalina da região interprismática do esmalte, exigindo a ação local de moléculas com elevado potencial de oxidação para causar sua fragmentação. Isso poderia explicar, mesmo que parcialmente, a redução na quantidade de H_2O_2 em todos os grupos onde os discos de esmalte/dentina foram submetidos ao manchamento. Por outro lado, esse aparente efeito protetor dos cromóforos ainda permitiu que a terapia clareadora empregada neste estudo se mantivesse citotóxica, o que está diretamente relacionado com a quantidade de H_2O_{2-free} capaz de alcançar o espaço pulpar. Esses resultados corroboram com investigações in vitro e pesquisas clínicas anteriores, onde foi demonstrado que géis clareadores de consultório, aplicados por períodos que variam de 30 à 45 min. sobre o esmalte, causam intenso efeito citotóxico associado com necrose parcial da polpa e inflamação (23,24). Além de aumentar a expressão das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-17, IL-23 e COX-2 (25,26), o excesso de H_2O_2 também interfere no fator de transcrição do receptor ativado por proliferadores de peroxissomos γ (PPAR γ) nas células, o que interfere com a remoção de EROs durante o processo inflamatório (27). Desta forma, concentrações elevadas de EROs causam intensa toxicidade e resultam em morte celular direta (28). Em tecidos vivos, como a polpa, isso pode ocasionar a liberação de grandes quantidades de componentes intracelulares, desencadeando uma reação inflamatória local aguda associada ou não à formação de amplas

áreas de necrose (23,24). Levando em consideração dados científicos de pesquisas anteriores e os resultados obtidos na presente pesquisa, é possível estabelecer que apesar dos cromóforos de diferentes origens presentes nos substratos dentários limitar a difusão trans-amelodentinária de H_2O_2 , a concentração desta molécula tóxica ainda é muito elevada nos géis atualmente empregados no clareamento dental convencional de consultório.

Os interessantes resultados obtidos com a realização desta pesquisa apresentam algumas limitações que devem ser consideradas. Primeiramente, é importante ressaltar que dentes bovinos são menos permeáveis ao H_2O_2 do que dentes humanos (29). Assim, é possível sugerir que maior difusão trans-amelodentinária dessa molécula reativa tóxica e efeitos citotóxicos mais intensos ocorreriam se amostras de dentes humanos fossem utilizadas neste estudo. Também, é importante considerar que os aspectos envolvidos na coloração dental são complexos, uma vez que os pigmentos podem ter origem intrínseca, extrínseca ou até mesmo ser uma combinação de ambas. Isso se configura como um fator relevante a ser ponderado quando da execução de estudos in vitro de clareamento dental. No entanto, este estudo proporcionou uma compreensão mais abrangente das inter-relações biológicas entre os cromóforos de pigmentação e o H_2O_2 , possibilitando uma contribuição significativa para futuras pesquisas na área de clareamento, principalmente para o aprimoramento de estudos laboratoriais. Além disso, é importante ressaltar que apenas três soluções de manchamento foram usadas de maneira isolada ou em combinação neste estudo. Portanto, outras investigações devem ser conduzidas para avaliar as diferentes moléculas coloridas encontradas nos tecidos mineralizados do dente e a possível influência delas sobre a citotoxicidade indireta de novos produtos e terapias clareadoras.

CONCLUSÃO

De acordo com a metodologia empregada neste estudo, foi possível que os diferentes protocolos de manchamento dos substratos dentários, usando para isso soluções coloridas de chá preto, café, vinho e uma combinação delas, reduzem, de maneira semelhante, a citotoxicidade trans-amelodentinária de um gel clareador com 35% H_2O_2 , aplicado por 45 min sobre o esmalte.

REFERÊNCIAS

1. Al-Zarea BK. Satisfaction with appearance and the desired treatment to improve aesthetics. *Int J Dent.*, 2013;2013.
2. Cavalcante L, Bomgiovanni C, Antunes K, et al. Color change, tooth sensitivity, aesthetic self-perceptions and quality of life after at-home dental bleaching. *Braz Dent Sci.*, 2022;25(1).
3. Maghaireh GA, Alzraikat H, Taha NA. Satisfaction with dental appearance and attitude toward improving dental esthetics among patients attending a dental teaching center. *J Contemp Dent Pract.*, 2016;17(1):16-21.
4. Rezende M, Loguercio AD, Kossatz S, Reis A. Predictive factors on the efficacy and risk/intensity of tooth sensitivity of dental bleaching: a multi regression and logistic analysis. *J Dent.*, 2016;45:1–6.
5. Gopinath S, James V, Vidhya S, et al. Effect of bleaching with two different concentrations of hydrogen peroxide containing sweet potato extract as an additive on human enamel: an in vitro spectrophotometric and scanning electron microscopy analysis. *J Conserv Dent.*, 2013;16:45–49.
6. Travassos AC, Torres CR, Borges AB, Barcellos DC. In vitro assessment of chemical activation efficiency during in office dental bleaching. *Oper Dent.*, 2010;35:8.
7. Khanmohammadi M, Dastjerdi MB, Ai A, et al. Horseradish peroxidase-catalyzed hydrogelation for biomedical applications. *Biomater Sci.*, 2018;6(6):1-43.
8. Gantumur E, Sakai S, Nkahata M, Taya M. Horseradish peroxidase-catalyzed hydrogelation consuming enzyme-produced hydrogen peroxide in the presence of reducing sugars. *Soft Matter.*, 2019;15(10):2163–2169.
9. Watts AM, Addy M. Tooth discolouration and staining: a review of the literature. *Br Dent J.*, 2001;190(6).
10. Ribeiro RAO, de Oliveira Duque CC, Ortecho-Zuta U, et al. Influence of manganese oxide on the esthetic efficacy and toxicity caused by conventional in-office tooth bleaching therapy. *Oper Dent.*, 2022;47(4):425-436.
11. de Oliveira Ribeiro RA, Zuta UO, Soares IPM, et al. Manganese oxide increases bleaching efficacy and reduces the cytotoxicity of a 10% hydrogen peroxide bleaching gel. *Clin Oral Investig.*, 2022;1-10.
12. Martins BV, Dias MF, de Oliveira Ribeiro RA, et al. Innovative strategy for in-office tooth bleaching using violet LED and biopolymers as H₂O₂ catalysts. *Photodiagn Photodyn Ther.*, 2022;102886.
13. Ortecho-Zuta U, de Oliveira Duque CC, de Oliveira Ribeiro RA, et al. Strategy for reducing cytotoxicity and obtaining esthetic efficacy with 15 min of in-office dental bleaching. *Clin Oral Investig.*, 2022;26(5):4099-4108.

14. Carlos NR, Pinto AVD, Do Amaral FLB, et al. Influence of staining solutions on color change and enamel surface properties during at-home and in-office dental bleaching: an in situ study. *Oper Dent.*, 2019;44(6):595-608.
15. de Oliveira Duque CC, Soares DG, Briso ALF, et al. Influence of tooth pigmentation on H₂O₂ diffusion and its cytotoxicity after in-office tooth bleaching. *Oper Dent.*, 2020;45(6):632-642.
16. Palandi SDS, Kury M, Picolo MZD, et al. Effects of black tea tooth staining previously to 35% hydrogen peroxide bleaching. *Braz J Oral Sci.*, 2022;22.
17. Grillon M, Di Bella E, Krejci I, Ardu S. In Vitro Evaluation of Tooth-Whitening Potential of Peroxide-Free OTC Dental Bleaching Agents. *Dent J.*, 2023;11(4):89.
18. Rezende M, Kapuchczinski AC, Vochikovski L, et al. Staining power of natural and artificial dyes after at-home dental bleaching. *J Contemp Dent Pract.*, 2019;20(4):425.
19. Sulieman M, Addy M, Rees JS. Development and evaluation of a method in vitro to study the effectiveness of tooth bleaching. *J Dent.* 2003;31(6):415-22.
20. Briso AL, Fagundes TC, Gallinari MO, et al. An in situ study of the influence of staining beverages on color alteration of bleached teeth. *Oper Dent.*, 2016;41(6):627-633.
21. Araújo LSND, dos Santos PH, Anchieta RB, et al. Mineral loss and color change of enamel after bleaching and staining solutions combination. *J Biomed Opt.*, 2013;18(10):108004-108004.
22. da Silva LMAV, Cintra LTA, de Oliveira Gallinari M, et al. Influence of Different Dye Substances on the Effectiveness of Bleaching and H₂O₂ Diffusion. *Oper Dent.*, 2022;47(6):648-657.
23. Roderjan DA, Stanislawczuk R, Soares DG, et al. Effect of medium or high concentrations of in-office dental bleaching gel on the human pulp response in the mandibular incisors. *Restor Dent Endod.*, 2023;48.
24. de Souza Costa CA, Riehl H, Kina JF, et al. Human pulp responses to in-office tooth bleaching. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.*, 2010;109(4):59-64.
25. Soares DG, Sacono NT, Ribeiro APD, et al. Pro-inflammatory mediators expression by pulp cells following tooth whitening on restored enamel surface. *Braz Dent J.*, 2022;33:83-90.
26. Benetti F, Gomes-Filho JE, Ferreira LL, et al. Concentration-dependent effect of bleaching agents on the immunolabelling of interleukin-6, interleukin-17 and CD5-positive cells in the dental pulp. *Int Endod J.*, 2018;51(7):789-799.
27. Lee YH, Kang YM, Heo MJ, et al. The survival role of peroxisome proliferator-activated receptor gamma induces odontoblast differentiation against oxidative stress in human dental pulp cells. *J Endod.*, 2013;39(2):236-241.
28. Wu TT, Li LF, Du R, et al. Hydrogen peroxide induces apoptosis in human dental pulp cells via caspase-9 dependent pathway. *J Endod.*, 2013;39(9):1151-1155.
29. Camargo SE, Valera MC, Camargo CH, et al. Penetration of 38% hydrogen peroxide into the pulp chamber in bovine and human teeth submitted to office bleach technique. *J Endod.*, 2007;33(9):1074-1077.

30. de Oliveira Duque CC, Soares DG, Basso FG, et al. Bleaching effectiveness, hydrogen peroxide diffusion, and cytotoxicity of a chemically activated bleaching gel. *Clin Oral Investig.* 2014;18:1631-1637.
31. Paravina RD, Pérez MM, Ghinea R. Acceptability and perceptibility thresholds in dentistry: a comprehensive review of clinical and research applications. *J Esthet Restor Dent.* 2019;31(2):103-112.
32. Del Mar Pérez P, Ghinea R, Rivas MJ, et al. Development of a customized whiteness index for dentistry based on CIELAB color space. *Dent Mater.* 2016;32(3):461-467.

3.2 Publicação 2*

INFLUÊNCIA DO TEMPO DE APLICAÇÃO DO LED VIOLETA SOBRE A EFICÁCIA ESTÉTICA E CITOTOXICIDADE DE UM GEL CLAREADOR COM 35% DE H₂O₂

RESUMO

Objetivo: Avaliar a possível influência do tempo de aplicação do LED violeta (V-LED) sobre a eficácia estética e citotoxicidade de um gel clareador com 35% de H₂O₂.

Metodologia: Discos de esmalte/dentina manchados e padronizados foram submetidos a 1 sessão (45 minutos) de clareamento dental de consultório, sendo o gel irradiado ou não com V-LED. Assim, os seguintes grupos foram estabelecidos (n=8): G1: sem tratamento (controle negativo, CN); G2: 35%H₂O₂ (controle positivo, CP); G3: 35%H₂O₂+V-LED15min; G4: 35%H₂O₂+V-LED30min; G5: 35%H₂O₂+V-LED45min. Inicialmente, a eficácia estética foi avaliada (ΔE_{00} e ΔWI). Discos montados em câmaras pulpares artificiais foram submetidos aos mesmos tratamentos clareadores. Então, os extratos (meio de cultura + componentes do gel clareador difundidos) foram coletados e aplicados sobre células pulpares MDPC-23, as quais foram analisadas quanto a viabilidade (Live/Dead, MTT) e estresse oxidativo (EOx). A quantidade de H₂O₂ nos extratos também foi determinada (violeta-leucocristal/peroxidase. Os dados obtidos foram submetidos a ANOVA/Tukey, com nível de significância de 5%.

Resultados: Apesar da eficácia estética não ter diferido entre os grupos irradiados G3, G4 e G5 ($p>0,05$), os resultados desses grupos foram superiores a G2 (CP; $p<0,05$). Nos grupos irradiados, a viabilidade e EOx celular, bem como a quantidade de H₂O₂ nos extratos foram estatisticamente semelhantes a G2 (CP), independente do tempo de irradiação usado ($p>0,05$).

Conclusão: Apesar do V-LED melhorar o resultado estético do clareamento dental de consultório, o aumento no tempo de irradiação não exerce influência sobre a alteração de cor e citotoxicidade desta terapia profissional.

* Artigo formatado segundo as normas de publicação do periódico *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* no qual foi publicado. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2022.103069>

INTRODUÇÃO

O peróxido de hidrogênio (H_2O_2), principal componente ativo dos géis clareadores, tem baixo peso molecular e potencial para oxidar moléculas orgânicas por contato direto [1]. Dessa forma, o H_2O_2 e algumas espécies reativas derivadas de sua degradação podem interagir com componentes orgânicos da substância inter-prismática do esmalte e assim se difundirem até a dentina subjacente, onde a maioria dos cromóforos se acumulam [2,3]. Os cromóforos são moléculas orgânicas coloridas, os quais são responsáveis pela determinação colorimétrica do elemento dental [4,5]. Quando os cromóforos são fragmentados pela ação do H_2O_2 , a taxa de absorção de luz pelos tecidos mineralizados do dente é reduzida [1,5]. Dessa forma, seria interessante que todo H_2O_2 dos géis clareadores pudesse interagir com os cromóforos presentes na dentina, visto que isso evitaria que H_2O_2 residual viesse alcançar o tecido pulpar [6,7]. No entanto, o baixo potencial de oxidação do H_2O_2 , quando comparado a outras espécies reativas derivadas do oxigênio (EROs) [8], faz com que parte do H_2O_2 liberado dos géis clareadores de consultório permaneça livre na dentina (free- H_2O_2) e assim consiga se difundir para o interior da câmara pulpar via túbulos dentinários [9]. Já foi demonstrado na literatura que esse fenômeno ocorre poucos minutos após a aplicação do gel clareador sobre o esmalte dentário [4,7,8,10]. Consequentemente, os efeitos adversos decorrentes do clareamento dental de consultório, tais como necrose parcial da polpa e sensibilidade pós-tratamento [11], parecem estar relacionados diretamente com a concentração de free- H_2O_2 na dentina [7,12].

Diversos protocolos que objetivavam diminuir a concentração de free- H_2O_2 que chega à câmara pulpar foram propostos na literatura. Esses protocolos foram baseados na redução da concentração dessa ERO nos géis clareadores [13] e do tempo de aplicação do gel clareador no esmalte [14]. Porém, esses protocolos testados não apresentaram resultados que justificassem sua utilização clínica. Mais recentemente, alguns pesquisadores propuseram o emprego da estratégia de aumentar da taxa de degradação da molécula de H_2O_2 liberada dos géis clareadores. Essa estratégia faria com que EROs com maior potencial de oxidação e menor tempo de meia-vida fossem geradas a partir do H_2O_2 , o que poderia favorecer o resultado estético e reduzir a quantidade de free- H_2O_2 na dentina. Para viabilizar essa estratégia inovadora, os pesquisadores começaram a avaliar o uso de metais de transição e enzimas com potencial catalisador, associado ou não a fotocatalise dos géis com LED num comprimento de onda visível violeta (V-LED) [12,15].

O uso do V-LED com a finalidade de clarear os dentes, mesmo na ausência de géis, tem sido relatado [16-20]. Esse procedimento é justificado pelo fato de que o comprimento de onda

do V-LED (405-410 nm) poderia corresponder ao pico de absorção dos cromóforos [16,17]. Como essas moléculas orgânicas coloridas são altamente reativas, especula-se que a presença da luz violeta poderia desencadear a instabilidade e quebra das ligações químicas, promovendo o efeito clareador por um processo foto-físico [16]. Diversos estudos apontam que o potencial clareador do V-LED é limitado quando utilizado isoladamente [18,20]. Entretanto, o uso do V-LED pode favorecer o resultado estético da técnica clareadora quando os géis contendo H_2O_2 são irradiados [18-20]. Por ser uma técnica recentemente introduzida para auxiliar a terapia clareadora, ainda não existe consenso sobre os melhores protocolos de aplicação do V-LED associado ao H_2O_2 e se o aumento no tempo de irradiação do gel poderia favorecer o resultado estético e/ou interferir nos efeitos citotóxicos do clareamento dental convencional de consultório.

Dessa forma, o objetivo do presente estudo foi avaliar se o aumento no tempo de irradiação de um gel clareador comercial de consultório (35% de H_2O_2) com V-LED pode favorecer a eficácia estética e diminuir a citotoxicidade trans-amelodentinária deste tipo de terapia profissional. A hipótese nula estabelecida para este estudo foi a de que o aumento no tempo de exposição de um gel clareador de consultório ao V-LED não exerce influência sobre a eficácia estética e citotoxicidade trans-amelodentinária do tratamento.

MATERIAIS E MÉTODOS

1. Obtenção das amostras (discos de esmalte e dentina bovinos): Quarenta e oito discos de esmalte e dentina foram obtidos da face vestibular de incisivos bovinos íntegros, usando para isso broca diamantada trefina (Dinser broca diamantadas LTDA, São Paulo, SP, Brasil) acoplada a uma furadeira de bancada (FSB 16 Pratika, Schultz, Joinville, SC, Brasil). O diâmetro dos discos foi padronizado em 5,6 mm, tendo a espessura total (esmalte/dentina) sido estabelecida em $2,3 \pm 0,2$ mm, através de desgastes realizados na dentina com lixas d'água de granulação 400 e 600 (T469-SF- Noton, Saint-Gobain Abrasivos Ltda., Jundiaí, SP, Brasil) [15].

2. Padronização das amostras: Após regularização da superfície dentinária, foi realizado a profilaxia da superfície do esmalte com pedra-pomes e água para eliminação de pigmentos superficiais. A dentina foi tratada com EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético; Sigma-Aldrich Corp., St Louis, MO, USA) 0,5 N por 30 segundos para remoção da smear layer. Após, os discos foram posicionados de forma padronizada em matriz de silicone branco, de maneira

que apenas a superfície de esmalte permanecesse exposta. O espectrofotômetro foi posicionado sobre cada espécime com o auxílio de um suporte fornecido pelo aparelho, sendo realizadas três leituras iniciais para obtenção de uma média dos valores de coloração de cada amostra, determinado pelas coordenadas $L^*a^*b^*$. Os valores das coordenadas $L^*a^*b^*$ (Comission Internationale de l'Eclairage) foram mensurados com espectrofotômetro de reflexão UV-Vis (Color Guide 45/0; BYK-Gardner GmbH, Geretsried, BAV, Germany), com comprimento de onda variando de 400 nm a 700 nm, iluminação padrão D65 e ângulo de iluminação/observação 45/0° [12,14,15].

3. Distribuição das amostras nos grupos experimentais: Após proceder a leitura inicial de cor, os discos foram submetidos a um protocolo de manchamento, através de imersão em 2 mL da solução de chá-preto (Matte Leão, Curitiba, PR, Brasil) por 24 horas. Então, para fazer o cálculo do CIEDE2000, a superfície em esmalte dos discos foi submetida à profilaxia com pasta de pedra-pomes e água e os discos passaram por nova leitura de cor para determinação dos valores médios das variáveis $L^*a^*b^*$.⁶ Os discos com os valores médios de CIEDE200 similares foram distribuídos aleatoriamente de acordo com os grupos apresentados na Tabela 1.

Tabela 1: Distribuição dos grupos (n=8) de acordo com os tratamentos.

GRUPOS	TRATAMENTOS	V-LED
G1	Controle negativo – Nenhum tratamento clareador realizado	-
G2	Controle positivo – Gel comercial contendo 35% de H ₂ O ₂ aplicado por 45 min	-
G3	Gel comercial contendo 35% de H ₂ O ₂ aplicado por 45 min	15 minutos de exposição ao V-LED
G4	Gel comercial contendo 35% de H ₂ O ₂ aplicado por 45 min	30 minutos de exposição ao V-LED
G5	Gel comercial contendo 35% de H ₂ O ₂ aplicado por 45 min	45 minutos de exposição ao V-LED

4. Protocolos de clareamento e Avaliação da Eficácia Clareadora (ΔE_{00} e ΔWI): Quarenta (n=8), aleatoriamente distribuídos entre os grupos de estudo, foram armazenados por 72 horas em ambiente com 100% umidade e 37°C. Para os protocolos clareadores, o gel clareador foi aplicado sobre a superfície de esmalte dos discos, esse gel permaneceu em contato com o

esmalte por um tempo total de 45 minutos (3x15minutos) sem exposição do V-LED (controle positivo) ou com a exposição do V-LED por 15, 30 ou 45 minutos. Imediatamente após concluir os procedimentos clareadores, os discos foram novamente armazenados com algodão embebido em água destilada em contato com a dentina [12,15]. Sobre o esmalte foi posicionado um algodão embebido em solução do tipo saliva (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 (Sigma-Aldrich Corp., St Louis, MO, EUA) por mais 72 horas em incubadora [12,15]. Ao final, foi realizada nova leitura de cor dos discos com o objetivo de determinar a possível alteração cromática pós-tratamento, sendo que para isso foram usadas as seguintes equações:

(I) Equação do CIEDE2000

$$\sqrt{\left(\frac{\Delta L'}{k_L S_L}\right)^2 + \left(\frac{\Delta C'}{k_C S_C}\right)^2 + \left(\frac{\Delta H'}{k_H S_H}\right)^2} + R_T \frac{\Delta C'}{k_C S_C} \frac{\Delta H'}{k_H S_H}$$

(II) Equação do Índice de Clareamento

$$\Delta WI = 0.511L - 2.3424a - 1.100b$$

$$\Delta DWI = \Delta WI_{\text{after bleaching}} - \Delta WI_{\text{baseline}}$$

5. Protocolo Experimental:

Cultivo celular: Células imortalizadas de linhagem odontoblástica MDPC-23 foram usadas neste estudo. As células foram semeadas em placas de 96 e 24 compartimentos (KASVI Imp., Curitiba, PR, Brasil) com meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; GIBCO, Grand Island, NY, 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 a 37°C, com 5% de CO₂ e 95% de ar [14,15].

Procedimento experimental: Quarenta e oito discos (n=8) foram adaptados em câmaras pulpares artificiais (CPAs), usando para isso dois anéis de silicone. Após vedar as bordas dos discos com cera utilidade (Cera 7 Rosa Wilson, Polidental, Cotia, SP, Brasil), os conjuntos disco/CPA foram esterilizados em óxido de etileno (Acecil, Central de Esterilização Comércio e Indústria LTDA, Campinas, SP, Brasil) [15]. Então, os conjuntos disco/CPA foram posicionados em placas de 24 compartimentos (KASVI Imp.) contendo 1 mL de DMEM sem

SFB, de tal forma que a solução permaneceu em contato com a dentina e o esmalte exposto para receber ou não os tratamentos (Tabela 1).

Obtenção dos extratos: Imediatamente após o término dos procedimentos clareadores, os extratos (DMEM + componentes dos géis clareadores que se difundiram pelos discos de esmalte/dentina) foram coletados, homogeneizados e divididos em alíquotas de 100 mL para realização dos testes descritos abaixo.

6. Avaliação da citotoxicidade trans-amelodentinária:

Viabilidade celular (Teste de MTT): Uma alíquota de 100 mL dos extratos foi aplicada por 1 hora sobre as células MDPC-23 (n=8) previamente semeadas em placas de 96 compartimentos. Então, os extratos foram aspirados e as células foram incubadas por 4 horas em contato com 90 µL de DMEM + 10 µL de solução de MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; Sigma-Aldrich Corp., St Louis, MO, USA) na concentração de 5 mg/mL de PBS, na proporção de 10:1. Após este período, os cristais de formazan foram dissolvidos em 100 µL de solução de isopropanol acidificado em HCl a 0,04 N, sendo a absorbância mensurada a 570 nm (Synergy H1, Biotek). O valor médio de absorbância obtido no grupo controle negativo foi considerado como 100% de viabilidade celular, sendo este parâmetro usado para calcular a viabilidade das células nos demais grupos [12,14].

Espécies Reativas de Oxigênio Intracelular (Estresse Oxidativo – Sonda H₂DCFDA): Células semeadas em placas de 96 compartimentos (KASVI Imp.) foram pré-tratadas com a sonda fluorescente carboxy-H₂DCFDA (Invitrogen, San Francisco, CA, EUA) na concentração de 5 mM durante 30 minutos a 37°C, sendo então expostas a 100 µL dos extratos. Imediatamente após, a fluorescência foi avaliada a 492 nm de excitação e 517 nm de emissão (Synergy H1, Biotek), sendo os valores normalizados pela média do grupo controle negativo [15].

Quantificação de free-H₂O₂: Para determinar a quantidade de H₂O₂ que se difundiu pelos discos de esmalte/dentina, uma alíquota de 100 µL dos extratos foi colocada em placas de 24 compartimentos contendo 900 µL de uma solução tampão acetato (2 mol/M, pH 4,5). Em seguida, um volume de 500 µL desta solução foi transferida para tubos contendo 100 µL de do reagente violeta leuco-cristal (0,5 mg/mL; Sigma-Aldrich), 50 µL de uma solução da enzima hoserhardish peroxidase (1 mg/ml; Sigma-Aldrich) e 2,750 mL de água destilada. A absorbância da solução foi mesurada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 596 nm (Synergy H1, Biotek). Os valores de densidade óptica foram convertidos em µg de H₂O₂

por mL de extrato (curva padrão), sendo estes transformados em porcentagem, considerando-se o grupo controle positivo como 100% de difusão de H_2O_2 residual [12,15].

Análise de Live/Dead: Este ensaio foi realizado com o kit Live/Dead Cell Viability/Cytotoxicity (Invitrogen, San Francisco, CA, EUA) (n=4), que utiliza a sonda de fluorescência Ethyl homodimer-1 (Eth-1) que se liga a bandas de DNA apenas em células com ruptura da membrana celular. A segunda sonda foi a Calcein AM (CA), que é hidrolisada por esterases citoplasmáticas em células viáveis.

7. Análise estatística: Os dados quantitativos foram avaliados quanto a aderência à curva normal e todos apresentaram normalidade (Shapiro-Wilk, $p>0,05$), além de homogeneidade de variância (Levene, $p>0,05$). Desse modo, a esses dados foram aplicados os testes de análise de variância a um critério fixo, os quais foram complementados por pós teste de Tukey. Todas as inferências estatísticas foram baseadas no nível de significância de 5%. Assim, grupos foram considerados estatisticamente diferentes quando $p<0,05$. O poder estatístico das análises foi realizado por meio da DDS Research (Statistical Power Calculator, $\alpha=5\%$).

RESULTADOS

Avaliação da Eficácia Clareadora (ΔE_{00} e ΔWI): Todos os grupos clareados, independente do uso ou não do V-LED (G2, G3, G4 e G5) demonstraram valores superiores aos encontrados em G1 (CN; $p<0,05$) (Figura 1A/B). A análise do ΔE_{00} demonstrou que a irradiação do gel com V-LED (G3, G4 e G5) aumenta significativamente a eficácia clareadora quando comparada ao gel não irradiado (G2; $p<0,05$) (Figura 1A). No entanto, o aumento no tempo de irradiação do gel não influenciou na eficácia estética final ($p>0,05$) (Figura1A). Quanto aos valores de ΔWI , a irradiação com V-LED (G3, G4 e G5) altera significativamente o potencial clareador do gel contendo 35% H_2O_2 quando comparado a G2 (CP; $p<0,05$). Porém, os valores de ΔWI foram estatisticamente semelhantes em G3, G4 e G5 ($p>0,05$) (Figura1B).

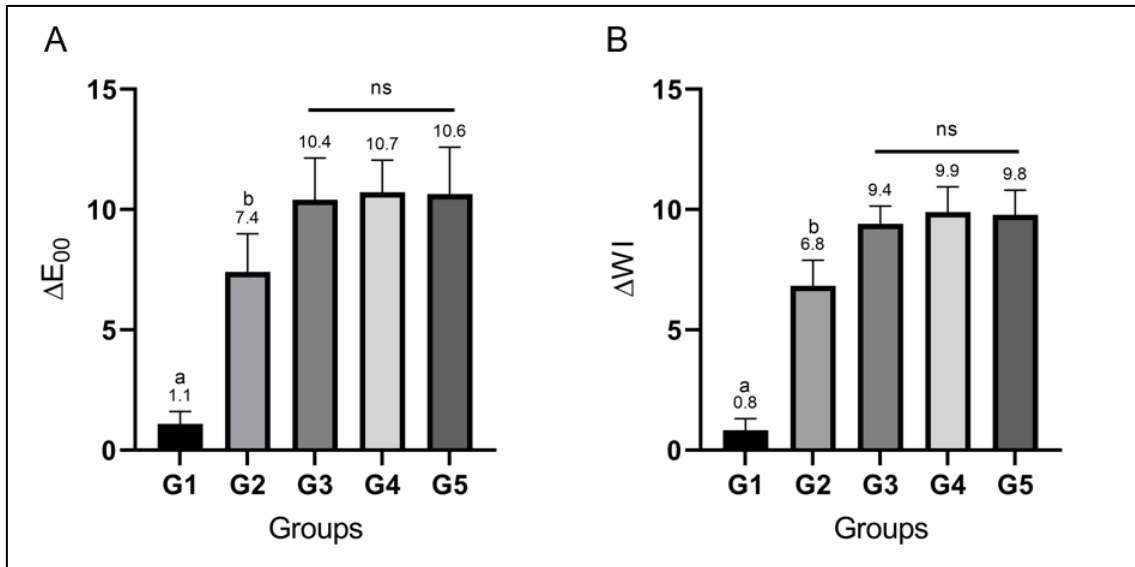


Figura 1. Análise da eficácia clareadora ΔE_{00} (A) e ΔWI (B). As barras representam valores médios e desvio padrão da alteração de cor. Os números demonstram o valor médio de cada grupo. Letras diferentes apontam para diferença estatisticamente significativa. ns = não houve diferença estatística (ANOVA/Tukey test; $p < 0,05$).

Avaliação da citotoxicidade trans-amelodentinária e difusão de H_2O_2 : O grupo controle negativo (G1) foi considerado como apresentando 100% de viabilidade celular. Assim, foi observado em todos os grupos clareados (G2, G3, G4 e G5), que as células MDFPC-23 tiveram diminuição de viabilidade quando comparado a G1 ($p < 0,05$). Viabilidade celular semelhante ocorreu em G3, G4 e G5, cujos valores obtidos também não diferiram de G2 (CP), o qual representou o clareamento convencional de consultório ($p > 0,05$) (Figura 2A). Quando comparado a G1, os maiores valores de EOx foram observados nos grupos clareados (G2, G3, G4 e G5) ($p < 0,05$), os quais não diferiram entre si ($p > 0,05$) (Figura 2B). A quantidade de free- H_2O_2 difundido pelos discos de esmalte/dentina e que alcançou o espaço pulpar foi semelhante entre os grupos clareados, independente do tempo de exposição do gel ao V-LED ($p > 0,05$) (Figura 2C). O ensaio de Live/Dead mostrou que todos os grupos clareados resultaram em aumento de células mortas, as quais foram marcadas positivamente com EthD-1 (vermelho) em comparação com G1 (Figura 2D). O padrão de diminuição significativa do número de células viáveis, as quais apareceram marcadas com Calcein AM (verde), foi observado em todos os grupos clareados (G2, G3, G4 e G5), independente do tempo de irradiação com V-LED (Figura 2D).

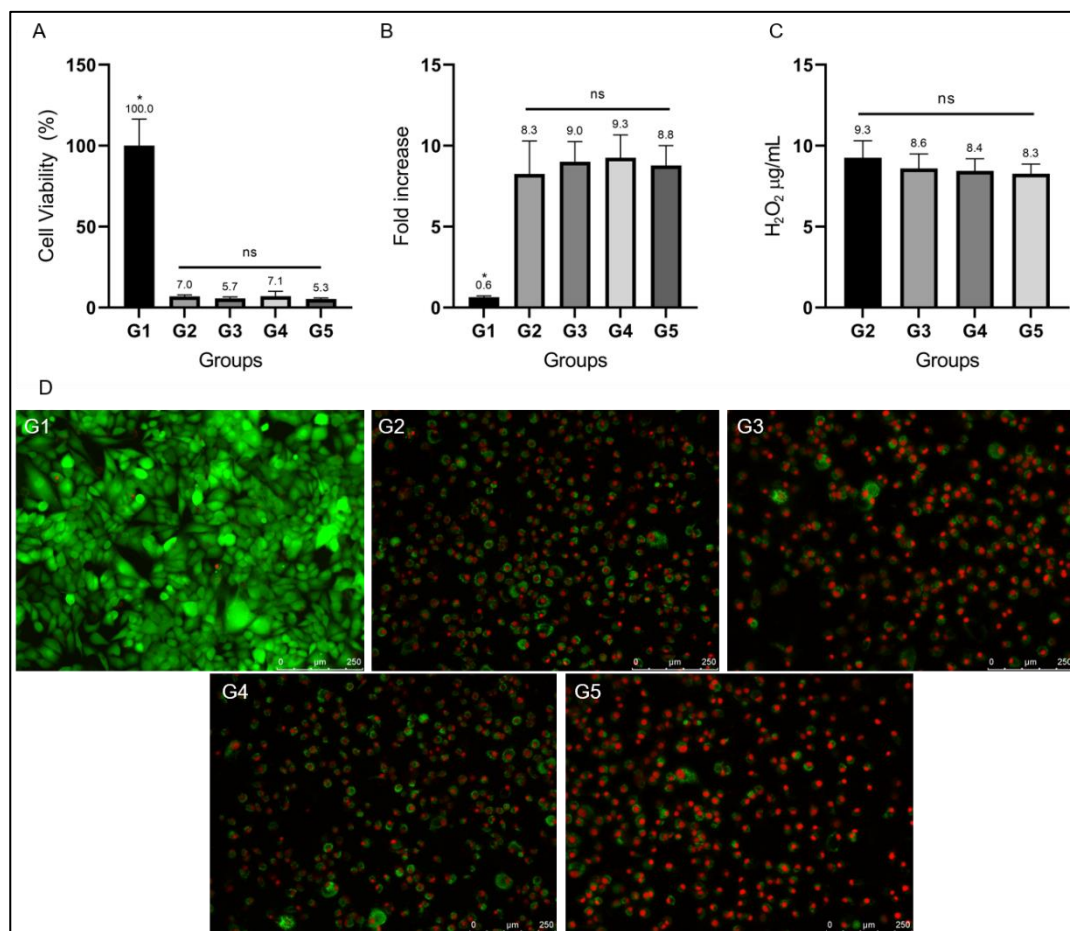


Figura 2. (A) Análise da viabilidade celular e (B) estresse oxidativo (C) análise da difusão de H₂O₂. As barras representam valores médios e desvio padrão da viabilidade celular e do estresse oxidativo. Os números demonstram o valor médio de cada grupo. Letras diferentes apontam para diferença estatisticamente significativa. ns = não houve diferença estatística (ANOVA/Tukey test; p<0,05). (D) Imagens da microscopia de fluorescência do ensaio de Live/Dead (10x). Nas imagens de microscopia as células coradas em verde (Calcein AM) se apresentam viáveis e as células coradas em vermelho (EthD-1) se apresentam em processo de morte celular.

DISCUSSÃO

A utilização de técnicas que promovam a catálise da molécula de H₂O₂ tem sido sugerida como uma alternativa interessante para o desenvolvimento de protocolos que possam auxiliar o clareamento dental, visando aumentar a eficácia estética e reduzir a citotoxicidade da terapia [12,15]. Dentre as diferentes estratégias recentemente propostas, a fotocatalise do H₂O₂ presente nos géis clareadores com V-LED parece ser bastante promissora [21-24].

Já foi demonstrado que parâmetros específicos de irradiação com V-LED, quando aplicados diretamente sobre o esmalte, degrada os cromóforos por um processo foto-físico [16,17]. Isso ocorre porque os cromóforos são moléculas orgânicas fotorreceptoras que apresentam cadeias altamente susceptíveis a quebra quando expostas a luz com comprimento de onda curto [16], como é o caso do V-LED. Desde que o pico de emissão do V-LED coincide

com o pico de absorção dos cromóforos (405-410 nm), esse tipo específico de irradiação atua seletivamente sobre o centro colorido dessas moléculas, quebrando-as em compostos menores e incolores [16]. Porém, alguns estudos demonstraram que a eficácia estética da aplicação isolada do V-LED sobre o dente é bastante limitada [20,21]. Assim, o V-LED foi selecionado, no presente estudo, para irradiar um gel contendo 35% de H_2O_2 , o qual tem sido amplamente usado no clareamento dental de consultório. Apesar de estudos prévios mostrarem que a associação do V-LED com géis clareadores favorece o resultado estético [20-24], praticamente não haviam informações na literatura sobre qual seria o tempo de irradiação ideal para aumentar a eficácia estética e diminuir os efeitos citotóxicos do tratamento.

De maneira geral, as análises de alteração de cor realizadas nessa pesquisa laboratorial mostraram que não houve diferença estatística entre os grupos G3, G4 e G5, nos quais o gel clareador foi irradiado com V-LED por diferentes períodos (Figura 1). Assim, foi possível observar que o aumento no tempo de fotocatalise com V-LED não favorece a eficácia clareadora do tratamento realizado com um gel contendo 35% de H_2O_2 . Entretanto, a irradiação do gel, independente do tempo, aumentou a eficácia clareadora em comparação ao uso isolado do gel sobre o esmalte. Esse resultado pode ser explicado pela fotocatalise da molécula de H_2O_2 causada pela irradiação do gel clareador com V-LED. Estudos prévios mostraram que a quebra da molécula de H_2O_2 em outros EROs, especialmente o radical hidroxila ($OH^\bullet$), acontece quando a irradiação é realizada num comprimento de onda de 365-405nm [25,26]. Na presente pesquisa, o V-LED usado exibia comprimento de onda de 405-410 nm, o que certamente favoreceu a fotocatalise do H_2O_2 presente no gel clareador, melhorando o resultado estético do procedimento.

Nesse momento, a principal preocupação e crítica sobre o clareamento convencional de consultório recai sobre o fato de que este tipo de terapia resulta, na maioria das vezes, em sensibilidade dentária [19-24], a qual parece ser desencadeada pelo intenso dano causado ao tecido pulpar [11]. Esses efeitos colaterais acontecem, pelo menos em parte, devido ao uso clínico de géis clareadores com elevadas concentrações de H_2O_2 na composição. Já foi demonstrado que o excesso de H_2O_2 que não reage com cromóforos presentes na dentina, denominados de free- H_2O_2 , conseguem se difundir via trans-amelodentária até a câmara pulpar, onde causam estresse oxidativo e lesão celular irreversível [27-29]. In vivo, os graves efeitos tóxicos causados pelo clareamento dental de consultório resultam em necrose parcial da polpa coronária e inflamação de sua porção radicular [7,30,31]. No presente estudo, foi observado que a irradiação do gel com V-LED, independente do tempo, não preveniu ou reduziu o efeito citotóxico trans-amelodentinário causado pela terapia clareadora. Assim, apesar do uso do V-

LED ter favorecido o resultado estético, o que indica que a irradiação degradou H_2O_2 e gerou outras EROs mais potentes, o emprego luz não foi capaz de reduzir os danos às células pulpares (Figura 2A/B). Considerando esse resultado, é possível sugerir que o efeito catalítico do V-LED aplicado sobre o gel clareador foi parcial e que muitos free- H_2O_2 ainda conseguiram se difundir para o espaço pulpar, tal como confirmado pela análise da quantidade dessa molécula nos extratos obtidos de cada grupo (Figura 2C). As imagens representativas do ensaio de Live/Dead também indicam que apesar da irradiação do gel com V-LED acelerar o processo de catálise do H_2O_2 , a concentração de free- H_2O_2 na dentina ainda se manteve elevada. Consequentemente, uma grande quantidade dessa molécula tóxica conseguiu se difundir para o espaço pulpar para causar a morte de muitas células MDPC-23. Esses resultados biológicos negativos indicam que a concentração de 35% de H_2O_2 num gel clareador é muito elevada e que talvez outras estratégias, tal como a associação de diferentes formas de catálise (química e/ou enzimática) do H_2O_2 necessitariam ser associadas a fotocatálise com V-LED. Recentemente, alguns pesquisadores avaliaram os efeitos da irradiação V-LED sobre géis clareadores com 10%, 20% e 35% de H_2O_2 aplicados sobre esmalte previamente revestido com um scaffold nanofibrilar e um biopolímero contendo uma enzima catalisadora. Os autores mostraram que esta estratégia inovadora aumentou a eficácia estética, bem como reduziu a toxicidade trans-amelodentinária do tratamento [15].

Apesar de pesquisas clínicas terem mostrado que a irradiação de géis clareadores com V-LED pode reduzir a sensibilidade pós-clareamento dental [20,32], é preciso considerar que vários estudos utilizaram géis com baixas concentrações de H_2O_2 [33] ou géis de peróxido de carbamida [21,34]. Dessa forma, é possível sugerir que a reduzida quantidade de H_2O_2 liberado dos géis para atuar no esmalte e dentina, evitaria, ou pelo menos limitaria, a difusão de altas concentrações de free- H_2O_2 até a polpa. Assim, o restrito dano pulpar poderia explicar a significativa queda no nível de sensibilidade dentária pós-clareamento dental relatada pelos diversos pesquisadores [35,36].

Levando em consideração o fato de que o aumento do tempo de irradiação com V-LED não resultou em aumento da eficácia estética e também não foi capaz de diminuir a citotoxicidade trans-amelodentinária do clareamento dental de consultório, a hipótese nula do presente estudo foi aceita. Porém, com base nos interessantes dados obtidos nessa pesquisa laboratorial, bem como em estudos prévios [15,18,20], a utilização do V-LED no clareamento de consultório pode ser considerada como uma alternativa coadjuvante atraente para aumentar a taxa de alteração de cor dos tecidos dentários. Quando associada a outras estratégias de catálise do H_2O_2 , a irradiação do gel com V-LED também pode ajudar a limitar os efeitos

tóxicos do clareamento dental de consultório, trazendo mais segurança para este tipo de terapia estética profissional [15,36].

Uma importante limitação do presente estudo se deve ao fato de que resultados de estudos laboratoriais não devem ser diretamente extrapolados para situações clínicas [7,37]. No presente estudo, células odontoblastóides MDPC-23 em cultura foram expostos os extratos obtidos de cada grupo. Esses extratos foram recolhidos após aplicação do gel clareador sobre o esmalte e irradiação deles por diferentes períodos. Assim, o efeito citotóxico trans-amelodentinário observado nos grupos G3, G4 e G5 se deveu exclusivamente aos protocolos clareadores avaliados nesse estudo, os quais permitiram intensa difusão de free- H_2O_2 pelo esmalte e dentina. Todavia, numa situação in vivo, os dentes vitais apresentam uma camada de odontoblastos revestindo internamente a dentina. Desta forma, além da difusão de free- H_2O_2 , o aquecimento gerado durante a irradiação com V-LED também poderia causar danos celulares indiretos. Isso porque protocolos de irradiação com V-LED pode elevar a temperatura intrapulpar [38], colocando células pulpares em risco de danos térmicos por aquecimento. No presente estudo in vitro, o qual mostrou que a variação no tempo de irradiação não influencia o resultado estético, a metodologia usada não permitiu determinar o possível efeito térmico causado com o aumento no tempo de irradiação do gel clareador, o que caracteriza a limitação dessa pesquisa laboratorial. Assim, seria interessante avaliar, em futuros estudos, estratégias mais seguras de clareamento dental utilizando o V-LED, porém estabelecendo o tempo de 15 minutos para fotocatalisar o H_2O_2 presente nos géis clareadores.

CONCLUSÃO

De acordo com a metodologia usada nesse estudo, foi possível concluir que apesar da irradiação com V-LED ter favorecido a alteração de cor do esmalte/dentina, o aumento do tempo de irradiação não melhora a eficácia estética e nem reduz a citotoxicidade trans-amelodentinária do clareamento dental de consultório.

REFERÊNCIAS

- [1] M. Goldberg, M. Grootveld, E. Lynch, Undesirable and adverse effects of tooth whitening products: a review, *Clin Oral Investig.* 14(1) (2010) 1-10. <https://doi.org/10.1007/s00784-009-0302-4>
- [2] B. Cvikl, A. Lussi, A. Moritz, S. Flury, Enamel surface changes after exposure to bleaching gels containing carbamide peroxide or hydrogen peroxide, *Oper Dent.* 41(1) (2016) E39-47. <https://doi.org/10.2341/15-010-L>
- [3] A.F. Ferreira, F.M. Perez, F.A. Júnior, M.F. Moura, F.B. Sousa, Graded changes in enamel component volumes resulted from a short tooth bleaching procedure, *Arch Oral Biol.* 65 (2016) 52-8. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2016.01.016>
- [4] A.L. Ubaldini, M.L. Baesso, A. Medina Neto, F. Sato, A.C. Bento, R.C. Pascotto, Hydrogen peroxide diffusion dynamics in dental tissues, *J Dent Res.* 92(7) (2013) 661-5. <https://doi.org/10.1177/0022034513488893>
- [5] C.M. Carey, Tooth whitening: what we now know, *J Evid Based Dent Pract.* 14 (2014) 70-6. <https://doi.org/10.1016/j.jebdp.2014.02.006>
- [6] D.G. Soares, N. Marcomini, F.G. Basso, T.N. Pansani, J. Hebling, C.A. de Souza Costa, Indirect cytocompatibility of a low-concentration hydrogen peroxide bleaching gel to odontoblast-like cells, *Int Endod J.* 49(1) (2016) 26-36. <https://doi.org/10.1111/iej.12426>
- [7] C.A. de Souza Costa, J. Hebling, D.L. Scheffel, D.G. Soares, F.G. Basso, A.P. Ribeiro, Methods to evaluate and strategies to improve the biocompatibility of dental materials and operative techniques, *Dent Mater.* 30(7) (2014) 769-84. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2014.04.010>
- [8] F.C. Marson, R.S. Gonçalves, C.O. Silva, L.T. Cintra, R.C. Pascotto, P.H. Santos, A.L.F. Briso, Penetration of hydrogen peroxide and degradation rate of different bleaching products, *Oper Dent.* 40(1) (2015) 72-9. <https://doi.org/10.2341/13-270-L>
- [9] K. Markowitz, Pretty painful: why does tooth bleaching hurt? *Med Hypotheses.* 74(5) (2010) 835-40. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2009.11.044>
- [10] C.R. Torres, C.S. Souza, A.B. Borges, M.F. Huhtala, T.M. Caneppele, Influence of concentration and activation on hydrogen peroxide diffusion through dental tissues in vitro, *Sci World J.* 2013 (2013) 193241. <https://doi.org/10.1155/2013/193241>
- [11] C.A. de Souza Costa, H. Riehl, J.F. Kina, N.T. Sacono, J. Hebling, Human pulp responses to in-office tooth bleaching, *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 109(4) (2010) e59-e64. <https://doi.org/10.1016/j.tripleo.2009.12.002>
- [12] C.C. Duque, D.G. Soares, F.G. Basso, J. Hebling, C.A. de Souza Costa, Bleaching effectiveness, hydrogen peroxide diffusion, and cytotoxicity of a chemically activated bleaching gel, *Clin Oral Investig.* (18) (2014) 1631-7. <https://doi.org/10.1007/s00784-013-1147-4>
- [13] B. Lilaj, R. Dauti, H. Agis, M. Schmid-Schwap, A. Franz, F. Kanz, A. Moritz, A. Schedle, B. Cvikl, Comparison of bleaching products with up to 6% and with more than 6% hydrogen peroxide: whitening efficacy using BI and WID and side effects—an in vitro study, *Front Physiol.* 919 (2019). <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00919>
- [14] D.G. Soares, A.P.D. Ribeiro, F. da Silveira Vargas, J. Hebling, C.A. de Souza Costa, Efficacy and cytotoxicity of a bleaching gel after short application times on dental enamel, *Clin Oral Investig.* 17(8) (2013) 1901-1909. <https://doi.org/10.1007/s00784-012-0883-1>
- [15] B.V. Martins, M.F. Dias, R.A. de Oliveira Ribeiro, M.L.D.A. Silva, J. Hebling, C.A. de Souza Costa, Innovative strategy for in-office tooth bleaching using violet LED

- and biopolymers as H₂O₂ catalysts, *Photodiagnosis Photodyn Ther.* (2022) 102886. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2022.102886>
- [16] F. Zanin, Recent advances in dental bleaching with laser and LEDs, *Photomed Laser Surg.* 34(4) (2016) 135-136. <https://doi.org/10.1089/pho.2016.4111>
- [17] V.H. Panhoca, B. Oliveira, A.S. Rastelli, V.S. Bagnato, Dental bleaching using violet light alone: clinical case report, *Dentistry.* 7(459) (2017) 2161-1122. <https://doi.org/10.4172/2161-1122.1000459>
- [18] M. Gallinari, T. Fagundes, L. da Silva, S.M. de Almeida, A. Barboza, A. Briso, A new approach for dental bleaching using violet light with or without the use of whitening gel: study of bleaching effectiveness, *Oper Dent.* 44 (2019) 521–529. <https://doi.org/10.2341/17-257-L>
- [19] A.P. Brugnera, S. Nammour, J.A. Rodrigues, E. Mayer-Santos, P.M. De Freitas, A. Brugnera, F. Zanin, Clinical evaluation of in-office dental bleaching using a violet light-emitted diode, *Photobiomodul Photomed Laser Sur.* 38 (2020) 98–104. <https://doi.org/10.1089/photob.2018.4567>
- [20] M. Kury, E.E. Wada, D.P.D. Silva, C.P.M. Tabchoury, M. Giannini, V. Cavalli, Effect of violet LED light on in-office bleaching protocols: a randomized controlled clinical trial, *J Appl Oral Sc.* 28 (2020). <https://doi.org/10.1590/1678-7757-2019-0720>
- [21] M. Kury, E.E. Wada, S. da Silva Palandi, M.Z.D. Picolo, M. Giannini, V. Cavalli, Colorimetric evaluation after in-office tooth bleaching with violet LED: 6-and 12-month follow-ups of a randomized clinical trial, *Clin Oral Investig.* 26(1) (2022) 837-847. <https://doi.org/10.1007/s00784-021-04062-9>
- [22] J.L.D.S.G. Costa, J.F. Besegato, M.C. Kuga, Bleaching and microstructural effects of low concentration hydrogen peroxide photoactivated with LED/laser system on bovine enamel, *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 35 (2021) 102352. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2021.102352>
- [23] A.N. de Souza Rastelli, H.B. Dias, E.T. Carrera, A.C.P. de Barros, D.D.L. Dos Santos, V.H. Panhóca, V.S. Bagnato, Violet LED with low concentration carbamide peroxide for dental bleaching: A case report, *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 23 (2018) 270-272. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2018.06.021>
- [24] M. de Oliveira Gallinari, L.T.A. Cintra, A.C.S. Barboza, L.M.A.V. da Silva, S. de Alcantara, P.H. Dos Santos, T.C. Fagundes, A.L.F. Briso, Evaluation of the color change and tooth sensitivity in treatments that associate violet LED with carbamide peroxide 10%: A randomized clinical trial of a split-mouth design, *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 30 (2020) 101679. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2020.101679>
- [25] K. Nakamura, M. Shirato, T. Tenkumo, T. Kanno, A. Westerlund, U. Örtengren, K. Sasaki, Y. Niwano, Hydroxyl radicals generated by hydrogen peroxide photolysis recondition biofilm-contaminated titanium surfaces for subsequent osteoblastic cell proliferation, *Sci Rep.* 9(1), (2019) 1-19. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41126-z>
- [26] H. Ikai, K. Nakamura, M. Shirato, T. Kanno, A. Iwasawa, K. Sasaki, Y. Niwano, M. Kohno, Photolysis of hydrogen peroxide, an effective disinfection system via hydroxyl radical formation, *Antimicrob Agents Chemother.* 54(12) (2010) 5086-5091. <https://doi.org/10.1128/AAC.00751-10>
- [27] B.M. Maran, T. de Paris Matos, A.D.S. de Castro, L. Vochikovski, A.L. Amadori, A.D. Loguercio, A. Reis, S.B. Berger, In-Office bleaching with low/medium vs. high concentrate hydrogen peroxide: A systematic review and meta-analysis, *J Dent.* 103 (2020) 103499. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2020.103499>
- [28] S.S. Meireles, M.E. Santos, I.M.C. Lustosa, E.L.L. Leite, Effects of a reduced in-office bleaching protocol with 37.5% hydrogen peroxide on effectiveness and tooth

- sensitivity: A double-blind randomized clinical trial, *J Esthet Restor Dent*. 33(5) (2021) 824-831. <https://doi.org/10.1111/jerd.12744>
- [29] C.C. de Oliveira Duque, D.G. Soares, F.G. Basso, J. Hebling, C.A. De Souza Costa, Influence of enamel/dentin thickness on the toxic and esthetic effects of experimental in-office bleaching protocols, *Clin Oral Investig*. 21(8) (2017) 2509-2520. <https://doi.org/10.1007/s00784-017-2049-7>
- [30] L.T.A. Cintra, F. Benetti, A.C. da Silva Facundo, L.L. Ferreira, J.E. Gomes-Filho, E. Ervolino, V. Rahal, A.L.F. Briso, The number of bleaching sessions influences pulp tissue damage in rat teeth, *J Endod*. 39(12) (2013) 1576-1580. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2013.08.007>
- [31] D.G. Soares, N.T. Sacono, A.P.D. Ribeiro, M.L. Leite, C.C.D.O. Duque, M.D.O. Gallinari, L.E. Pacheco, J. Hebling, C.A.D.S. Costa, Pro-inflammatory mediators expression by pulp cells following tooth whitening on restored enamel surface, *Braz Dent J*. 33(2) (2022) 83-90. <https://doi.org/10.1590/0103-6440202204688>
- [32] A.E.C.G. Dos Santos, S.K. Bussadori, M.M. Pinto, D.A.P. Junior, A. Brugnera Jr, F.A.A. Zanin, M.F.S.D. Rodrigues, L.J. Motta, A.C.R.T. Horliana, Evaluation of in-office tooth whitening treatment with violet LED: protocol for a randomized controlled clinical trial, *BMJ open*, 8(9) (2018) e021414. <http://dx.doi.org/10.1136/bmjopen-2017-021414>
- [33] M. de Oliveira Gallinari, L.T.A. Cintra, M.B. de Almeida Souza, A.C.S. Barboza, L.M.B. Esteves, T.C. Fagundes, A.L.F. Briso, Clinical analysis of color change and tooth sensitivity to violet LED during bleaching treatment: a case series with split-mouth design, *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 27 (2019) 59-65. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2019.05.016>
- [34] M. Kury, B.A. Resende, D.P. Silva, E.E. Wada, F.M. Antonialli, M. Giannini, V. Cavalli, Clinical application of violet LED in-office bleaching with or without traditional systems: case series, *Oral Health Dent Stud*, 2(1) (2019) 1-11. <https://doi.org/10.31532/OralHealthDentStud.2.1.001>
- [35] D.G. Soares, F.G. Basso, J. Hebling, C.A. de Souza Costa, Concentrations of and application protocols for hydrogen peroxide bleaching gels: effects on pulp cell viability and whitening efficacy, *J Dent*. 42(2) (2014) 185-198. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2013.10.021>
- [36] J.F. Bortolatto, T.C. Trevisan, P.S.I. Bernardi, E. Fernandez, L.N. Dovigo, A.D. Loguercio, O.B. de Oliveira Jr, H. Pretel, A novel approach for in-office tooth bleaching with 6% H₂O₂/TiO₂ and LED/laser system—a controlled, triple-blinded, randomized clinical trial, *Lasers Med Sci*. 31(3) (2016) 437-444. <https://doi.org/10.1007/s10103-016-1866-2>
- [37] V. Rosa, G. Sriram, N. McDonald, B.N. Cavalcanti, A critical analysis of research methods and biological experimental models to study pulp regeneration, *Int Endod J*. 55 (2022) 446-455. <https://doi.org/10.1111/iej.13712>
- [38] B.K. de Almeida Guanaes, T.N. Duarte, G.M. Correr, M. da Rosa Kaizer, C.C. Gonzaga, In-office dental bleaching with violet light emitting diode: bleaching efficacy and pulpal temperature rise, *Restor Dent Endod*, 47(1) (2022). <https://doi.org/10.5395/rde.2022.47.e7>

3.3 Publicação 3*

A associação de biopolímeros com o LED violeta pode aumentar a eficácia clareadora, reduzir a citotoxicidade e o tempo de clareamento dental de consultório.

RESUMO:

O objetivo deste estudo foi avaliar a influência do uso conjunto de um scaffold de nanofibras (SN), um primer polimérico catalisador (PPC) contendo 10 mg/mL da enzima peroxidase hêmica e do LED violeta (LEDv) sobre a eficácia estética (EE), citotoxicidade trans-amelodentinária (CT) e tempo de realização da terapia clareadora convencional de consultório. Para isso, 96 discos padronizados de esmalte/dentina foram obtidos, manchados e então adaptados em câmaras pulpares artificiais. Sobre o esmalte, previamente recoberto ou não com SN+PPC, foi aplicado por 45, 30 ou 15 min. um gel clareador com 35% H_2O_2 , o qual foi irradiado ou não por 15 min. com LEDv. Assim, os seguintes grupos foram estabelecidos: G1 – controle negativo; G2 – 35% H_2O_2 /45 min.; G3 – SN+PPC+LEDv; G4 – SN+PPC+35% H_2O_2 /45min.+LEDv; G5 – SN+PPC+35% H_2O_2 /30min.+LEDv; e G6 – SN+PPC+35% H_2O_2 /15min.+LEDv. Os extratos (meio de cultura + componentes dos géis difundidos pelos discos) foram coletados e aplicados sobre células MDPC-23. Foi avaliado a EE (ΔE_{00} e ΔWI) e a CT (ANOVA/Tukey; $p < 0,05$). Quanto a análise de EE, não houve diferença estatística entre G6 e G2 ($p > 0,05$). Maior viabilidade e menor nível de estresse oxidativo ocorreu nas células em G6 quando comparado aos demais grupos clareados ($p < 0,05$). Concluiu-se que a estratégia de catalisar, por meio do uso conjunto de SN+PPC+LEDv, um gel clareador com 35% H_2O_2 aplicado por apenas 15 min. sobre o esmalte, foi capaz de alcançar a EE e reduzir a CT comumente causada pela terapia clareadora convencional de consultório.

* Artigo formatado segundo as normas de publicação do periódico *Lasers in Medical Science* no qual foi publicado. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10103-023-03962-4>

INTRODUÇÃO

A demanda por um sorriso mais claro aumentou consideravelmente em todo mundo, sendo que até mesmo pessoas com sorrisos esteticamente agradáveis se mostraram insatisfeitos com a cor de seus dentes [1]. Dentre os procedimentos estéticos usados para melhorar a estética do sorriso, o clareamento dental desponta como uma técnica conservadora, segura e minimamente invasiva [2]. Além disso, diversos estudos mostraram que alterar a cor dos elementos dentários, através do uso de diversos protocolos de clareamento dental, aumenta a satisfação com o sorriso e impacta positivamente a qualidade de vida dos pacientes [3-5].

Para realizar o clareamento dental convencional de consultório (CDCC), géis clareadores com elevadas concentrações de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) têm sido amplamente usados [6]. O principal questionamento com relação ao emprego desta terapia estética profissional está associado ao elevado risco de sensibilidade pós clareamento (SC) [7,8]. Estudos mostraram que 50% – 93% dos pacientes que se submetem ao CDCC se queixam de SC [8,9]. O número de pacientes que vivenciaram este efeito adverso pelo menos uma vez durante o tratamento é de até 61%, sendo que numa escala de dor de 0 – 4, a média de intensidade de dor relatada é de 2,8 [10]. Já foi relatado que a SC ocorre, pelo menos em parte, devido a capacidade do H_2O_2 se difundir pelo esmalte e dentina para causar danos ao tecido pulpar, sendo que esse efeito colateral está diretamente relacionado com a concentração desta molécula altamente reativa presente nos géis de consultório [11]. Pesquisadores mostraram que quanto maior a quantidade de H_2O_2 na polpa, maior o nível de estresse oxidativo celular [12-15], o que causa lesão nas células pulpares e induz inflamação neste tecido conjuntivo especializado [15,16].

Estudos prévios demonstraram que a estratégia de reduzir a concentração de H_2O_2 no gel clareador e/ou o tempo de aplicação do produto sobre o esmalte, prejudica o resultado estético da terapia [12,17]. Essas estratégias exigiram que um maior número de sessões clínicas de clareamento dental fosse aplicada, o que pode limitar seu emprego na prática clínica [18,19]. Diante disso, alguns pesquisadores passaram a avaliar protocolos de clareamento dental baseado na catálise do H_2O_2 presente nos géis clareadores; essas estratégias apresentaram resultados interessantes, visto que a degradação do H_2O_2 gerou moléculas com elevado potencial oxidativo e reduzido tempo de meia-vida [13,20,21]. Dentro deste contexto, já foi demonstrado que o polímero hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) consegue carrear moléculas catalisadoras capazes de aumentar a taxa de degradação do H_2O_2 , e que sua associação com scaffolds eletrofiados a base de policaprolactona (PCL) produz resultados ainda mais

significativos [13,22,23]. Esses autores mostraram que o uso conjunto destes biopolímeros no clareamento dental de consultório pode reduzir a citotoxicidade e aumentar o resultado estético desta terapia profissional. Mais recentemente, foi relatado que a fotocatálise do H_2O_2 com LED violeta (LEDv) também favorece o resultado estético de géis clareadores, sem aumentar a citotoxicidade da terapia [24]. O uso combinado da fotocatálise (LEDv) com biopolímeros catalisadores parece favorecer ainda mais os resultados estéticos e a biocompatibilidade do clareamento dental realizado em consultório [22].

Considerando os importantes avanços obtidos até o momento sobre o emprego de diferentes métodos de catálise do H_2O_2 para realizar protocolos de clareamento dental, o objetivo deste estudo foi avaliar a influência do uso conjunto de um scaffold de nanofibras (SN), um primer polimérico catalisador (PPC) contendo 10 mg/mL da enzima peroxidase hêmica e do LED violeta (LEDv) sobre a eficácia estética (EE), citotoxicidade trans-amelodentinária (CT) e possível redução no tempo para executar o CDCC. A hipótese nula foi de que o uso combinado de SN+PCP+LEDv no clareamento dental de consultório não interfere na alteração de cor, citotoxicidade e no tempo de aplicação de um gel clareador de consultório.

MATERIAIS E MÉTODOS

1.1 Cálculo do tamanho da amostra: O número de réplicas biológicas para as variáveis de resposta "eficácia estética" e "citotoxicidade" foi calculado usando o software G*Power (versão 3.1; University Dusseldorf, Dusseldorf, Alemanha). O poder do teste (probabilidade de erro $1-\beta$) e probabilidade de erro α foram 0,80 e 0,05, respectivamente. O tamanho do efeito para eficácia estética foi de 4,03 e a citotoxicidade trans-amelodentinária foi de 3,35. O tamanho estimado da amostra de 8 espécimes/grupo foi definido para todas as variáveis de resposta. Cada protocolo foi conduzido em dois experimentos separados (duplicatas) para minimizar erros sistemáticos e permitem a reprodutibilidade da observação.

1.2 Formulação do Scaffold de Nanofibras (SN; n=8): Uma solução de 12,5% de policaprolactona (PCL; Sigma-Aldrich) foi preparada com clorofórmio/dimetilformamida (80:20) (Labsynth Produtos para laboratório, São Paulo, SP, Brasil) sob agitação magnética constante overnight [13]. A solução obtida foi transferida para uma seringa de 5 mL (Descarpak, São Paulo, SP, Brasil) com agulha de aço inoxidável de calibre de 18 gauge (Becton Dickinson, Franklin Lakes, Nova Jersey, EUA), a qual foi conectada em equipamento de injeção automática (KDSscientific, Holliston, MA, EUA) sob a velocidade de 1 mL/h. A voltagem da fonte de alta

tensão foi de 12 kV e uma distância 15 cm foi mantida entre a ponta da agulha e o coletor plano. O biopolímero de nanofibras aderido ao coletor foi cuidadosamente removido, sendo que amostras circulares com 6 mm de diâmetro foram obtidas com auxílio de um punch dermatológico (Koplast, Barra do Rio, Jaraguá do Sul, SC, Brasil) [13,22,23].

1.3 Formulação do Primer Polimérico Catalisador (PPC; n=8): Foi preparado um PPC resistente ao escoamento e capaz de formar uma película homogênea sobre o esmalte [13]. Para isso, hidroxipropil metilcelulose (HPMC; Sheffcel, Kerry; Beloit, WI, EUA) foi usado como polímero base. O pó de HPMC (1 g) na viscosidade de 100 mPa.s. foi diluído em H₂O_{UP} (10 mL) para obter uma solução a 10%. O gel, preparado sob agitação magnética por 6 h em temperatura ambiente, foi então armazenado na geladeira por 24 h. A enzima peroxidase hêmica (HRP; Sigma-Aldrich) foi incorporada (10 mg/mL) na solução de HPMC como agente catalisador, dando origem ao PPC.

1.4 Obtenção e padronização dos discos de esmalte e dentina: Noventa e seis discos de esmalte/dentina padronizados (5,6 mm de diâmetro) foram obtidos de incisivos bovinos íntegros, por meio do uso de uma broca diamantada do tipo trefina (Dinser brocas diamantadas Ltda., São Paulo, SP, Brasil) acoplada a uma furadeira de bancada (FSB 16 Pratika, SchuL tz, Joinville, SC, Brasil). 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 até obter-se espessura padronizada de 2,3 mm de esmalte/dentina simulando a espessura de incisivos inferiores [19-24].

1.5 Avaliação da eficácia estética (n=8): Discos de esmalte/dentina foram submetidos ao procedimento laboratorial de manchamento com chá-preto [20-24], e então distribuídos em grupos (Tabela 1). Nos grupos G3, G4, G5 e G6, a superfície do esmalte dos discos foi recoberta com SN, sobre o qual foi aplicado 10 µL do PPC (Figura 1). Em seguida, após serem manipulados e aplicados sobre os biopolímeros, os géis clareadores (G4, G5 e G6) foram irradiados por 15 minutos com LED Violeta (MMOptics, São Carlos, SP, Brasil) [24]. Com os discos posicionados numa matriz de silicone branco, procedeu-se a análise da eficácia clareadora por meio de um espectrofotômetro de reflexão UV (Espectrofotômetro de Reflexão ML Color Guide, BYK Gardner GmbH Geretsried, Alemanha). Os valores de L*a*b*, obtidos antes (*baseline*) e 72 horas após concluir os procedimentos clareadores, foram utilizados para

avaliar a alteração de cor (CIEDE 2000, ΔE_{00}). O índice de clareamento (ΔWI) foi determinado de acordo com as seguintes equações:

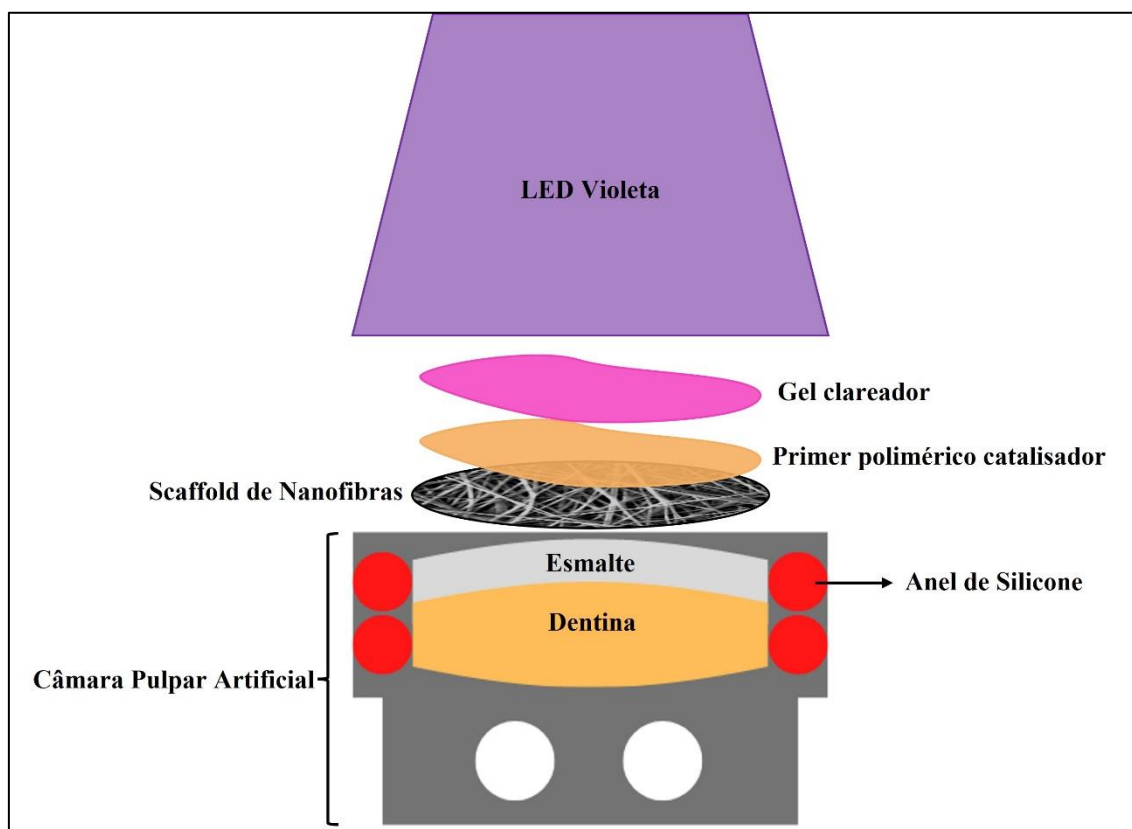
$$\begin{aligned} \text{a)} \quad & \sqrt{\left(\frac{\Delta L'}{k_L S_L}\right)^2 + \left(\frac{\Delta C'}{k_C S_C}\right)^2 + \left(\frac{\Delta H'}{k_H S_H}\right)^2} + R_T \frac{\Delta C'}{k_C S_C} \frac{\Delta H'}{k_H S_H} \\ \text{b)} \quad & WI = 0,511L^* - 2,3424a^* - 1,100b^* \\ \text{c)} \quad & \Delta WI = WI - WI_{\text{baseline}} \end{aligned}$$

A seguir, os parâmetros de cor (ΔE_{00} e ΔWI) obtidos para todos os grupos foram analisados estatisticamente tal como descrito abaixo. Os valores dos limiares de perceptibilidade (PT) e aceitabilidade (AT) foram adotados como 50:50%, ΔE_{00} foram 0,8 (PT) e 2,7 (AT) e ΔWI foram 0,72 (PT) e 2,60 (AT) (Paravina et. al, 2019).

Tabela 1. Distribuição dos grupos controles e experimentais.

GRUPOS	GEL CLAREADOR	SN+PPC+LEDv	PROTOCOLO
G1	-	-	Nenhum tratamento realizado
G2	X	-	Gel clareador comercial (Whiteness HP, FGM) aplicado por 45 minutos
G3	-	X	Revestimento do esmalte com o SN + PPC seguido de irradiação com o LEDv por 15 minutos
G4	X	X	Revestimento do esmalte com o SN + PPC, seguido da aplicação do gel clareador (Whiteness HP, FGM) por 45 minutos e irradiação com o LEDv por 15 minutos
G5	X	X	Revestimento do esmalte com o SN + PPC, seguido da aplicação do gel clareador (Whiteness HP, FGM) por 30 minutos e irradiação com o LEDv por 15 minutos
G6	X	X	Revestimento do esmalte com o SN + PPC, seguido da aplicação do gel clareador (Whiteness HP, FGM) por 15 minutos e irradiação com o LEDv por 15 minutos

Figura 1. Representação esquemática dos protocolos experimentais avaliados no presente estudo.



2 Citotoxicidade trans-amelodentinária

2.1 Cultura de Células MDPC-23: Células imortalizadas de linhagem odontoblástica MDPC-23 foram cultivadas em placas esterilizadas de 75 cm² (KASVI Imp., Curitiba, PR, Brasil), usando para isso meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; GIBCO, Grand Island, NY, EUA) contendo 10% de soro fetal bovino (SFB; GIBCO), 100 IU/mL e 100 µg/mL, respectivamente de penicilina e estreptomicina e 2 mmol/L de glutamina (GIBCO) em uma atmosfera umedecida a 37°C, com 5% de CO₂ e 95% de ar. As células foram submetidas a passagens até obter o número adequado para realização do experimento.

2.2 Procedimento Experimental: Discos de esmalte/dentina foram adaptados em câmaras pulpares artificiais (CPAs), sendo os conjuntos discos/CPAs esterilizados em óxido de etileno (Acecil, Central de Esterilização Comércio e Indústria LTDA, Campinas, SP, Brasil). Então, cada conjunto foi individualmente posicionado no compartimento de placas de acrílico esterilizadas de 24 compartimentos (KASVI Imp.) contendo 1 mL de DMEM [19-24]. Imediatamente após realizar o procedimento clareador sobre o esmalte, os extratos (DMEM +

componentes dos géis clareadores que se difundiram pelo esmalte e dentina) foram coletados e usados nos testes de citotoxicidade.

2.3 Quantificação do H_2O_2 nos extratos ($n=8$): Alíquotas de 100 μ L dos extratos obtidos de cada grupo foram transferidas para tubos plásticos de 5 mL (KASVI Imp.) contendo 900 μ L de solução tampão acetato (2 mol/L; pH 4,5), o qual permite a estabilização do H_2O_2 . Em seguida, 500 μ L desta solução foi transferido para novos tubos plásticos de 5 mL (KASVI Imp.) contendo água e corante violeta leucocristal (0,5 mg/mL, Sigma-Aldrich). Os tubos foram agitados em vortex e 50 μ L de solução de 1 mg/mL da enzima horseradish peroxidase (Sigma-Aldrich) foi adicionada. A absorbância das soluções foi medida em espectrofotômetro (Synergy H1) com comprimento de onda de 596 nm. A curva padrão de quantidades conhecidas de H_2O_2 foi utilizada para a conversão dos valores de densidade óptica obtidos das amostras em μ g de H_2O_2 por mL de extrato [19-24].

2.4 Avaliação da viabilidade celular (Teste de alamarBlue; $n=8$): Alíquotas de 100 μ L de cada extrato foram aplicadas sobre células MDPC-23 previamente cultivadas (10.000 células) em compartimentos de placas de acrílico esterilizadas de 96 compartimentos (KASVI Imp.). Após 1 h de incubação, os extratos foram aspirados e as células que permanecerem aderidas ao fundo dos compartimentos foram incubadas por 4 hs em contato uma solução composta por 90 μ L de DMEM e 10 μ L da solução Alamar Blue (Life Technologies; Grand Island, NY, EUA). Então, a solução foi coletada e transferida para uma placa de 96 compartimentos (KASVI Imp.), sendo a absorbância mensurada a 570 nm em espectrofotômetro (Synergy H1, Biotek, Winooski, EUA) [19-24].

2.5 Análise do estresse oxidativo celular ($n=8$): O estresse oxidativo celular foi avaliado por meio da estimativa da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) pelas células imediatamente após o clareamento. Para isto, células MDPC-23 previamente cultivadas em compartimentos de placas esterilizadas de 96 compartimentos foram expostas por 30 min à sonda carboxy-H2DCFDA (Invitrogen, San Francisco, CA, EUA) na concentração de 10 μ g/mL. Esta sonda é permeável à membrana celular e emite fluorescência quando em contato com EROs. Na sequência, alíquotas de 100 μ L dos extratos de cada grupo foram aplicadas sobre as células por 1 h e a intensidade de fluorescência avaliada a 592 nm excitação e 517 nm emissão (Synergy H1) após o período de exposição aos extratos. Os dados foram normalizados pelo grupo controle negativo, tal como previamente descrito [19-24].

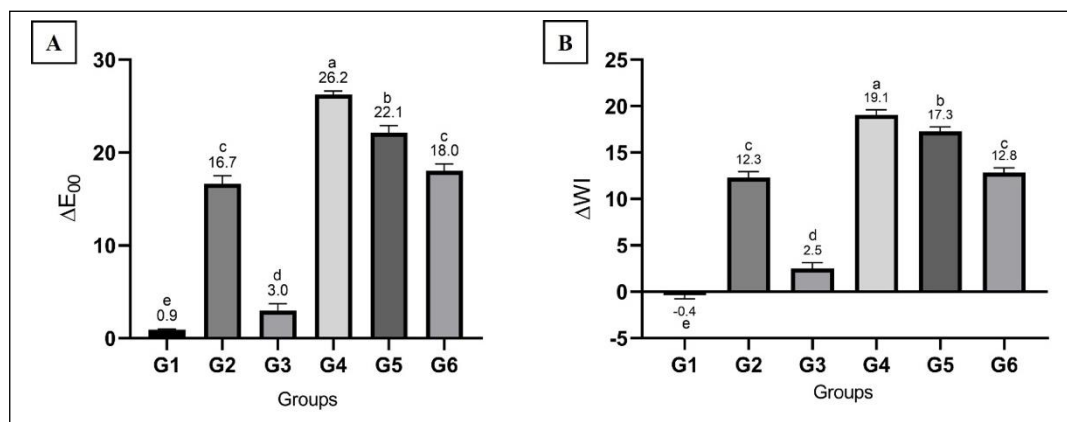
2.6 Avaliação da morfologia celular (n=4): Para esta análise, células MDPC-23 foram semeadas sobre lamínulas de vidro posicionadas no fundo de placas de 24 compartimentos, e os mesmos procedimentos clareadores descritos anteriormente foram realizados. Após incubação das células em contato com os extratos, estes foram aspirados e as células MDPC-23 que permaneceram aderidas às lamínulas de vidro foram fixadas e processadas para posterior análise microscópica [13]. Após montagem em stubs metálicos, as lamínulas com as células foram submetidas à metalização com ouro (Sistevac, Rolândia, PR, Brasil). Finalmente, a morfologia das células MDPC-23 foi avaliada em microscópio eletrônico de varredura (MEV, JEOL JSM 6610; JEOL Ltda, Akishima, Tokio, Japão), de tal forma que fotomicrografias representativas de cada grupo foram obtidas.

3 Análise estatística: Os dados coletados foram submetidos ao teste de Shapiro-Wilk para avaliação da normalidade e ao teste de Levene para avaliação da homoscedasticidade. Para os ensaios de eficácia estética, viabilidade celular, estresse oxidativo e difusão de H_2O_2 foi realizada análise de variâncias a dois critérios (Two-Way ANOVA), onde a interação entre as variáveis foi avaliada, seguido do pós teste de Tukey. Todas as análises estatísticas realizadas empregaram um nível de significância de 5% (IBM SPSS Statistics for Windows, Version 25.0, Armonk, NY).

RESULTADOS

Avaliação da eficácia estética: A aplicação da equação do ΔE_{00} demonstrou um discreto potencial clareador no grupo G3 quando comparado ao G1 (controle negativo) ($p < 0,05$) (Figura 2A). O uso do SN+PPC+LEDv aumentou significativamente a alteração de cor nos grupos G4 e G5, onde o gel foi mantido sobre o esmalte por 45 e 30 minutos, respectivamente, quando comparado ao G2 (controle positivo) ($p < 0,05$) (Figura 2A). O potencial clareador observado em G6 foi semelhante o G2 ($p > 0,05$), onde o protocolo tradicional de clareamento foi empregado (Figura 2A). Resultados semelhantes ocorreram quando da análise do ΔWI (Figura 2B). A presença do SN+PPC+LEDv aumentou significativamente a alteração de cor para G4 e G5 quando comparado a G2 ($p < 0,05$), não havendo diferença estatística entre G6 e G2 ($p > 0,05$).

Figura 2. Análise da alteração de cor (A - ΔE_{00} e B - ΔWI). Barras representam valores médios e desvio-padrão. Números demonstram a média de cada grupo. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes (n=8; ANOVA/Tukey. =5%).

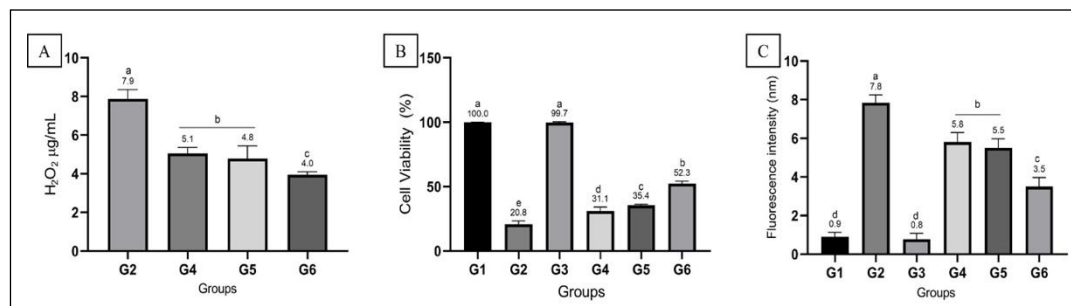


Quantificação do H_2O_2 nos extratos: Maior difusão de H_2O_2 ocorreu em G2 (controle positivo) quando comparado a G4, G5 e G6, onde diferentes estratégias catalisadoras foram testadas (Figura 3A; $p < 0,05$). G4 e G5, onde foi utilizado SN+PPC+LEDv, e o gel clareador foi mantido sobre o esmalte por 45 ou 30 minutos, respectivamente, foram estatisticamente semelhantes ($p > 0,05$). G6 apresentou o menor valor de difusão trans-amelodentinária de H_2O_2 em comparação a todos os demais grupos deste estudo ($p < 0,05$).

Avaliação da viabilidade celular: Redução da viabilidade celular ocorreu em todos os grupos onde foi aplicado o gel clareador, independente do uso ou não do SN+PPC+LEDv e do tempo de aplicação do gel clareador, quando comparados a G1 (controle negativo) e G3(SN+PPC+LED) (Figura 3B; $p < 0,05$). Dentre os grupos clareados, o maior valor de viabilidade das células MDPC-23 foi observado em G6 ($p < 0,05$). Quando comparado aos demais grupos, a menor viabilidade celular ocorreu em G2 (controle positivo), o qual representou o clareamento convencional de consultório ($p < 0,05$).

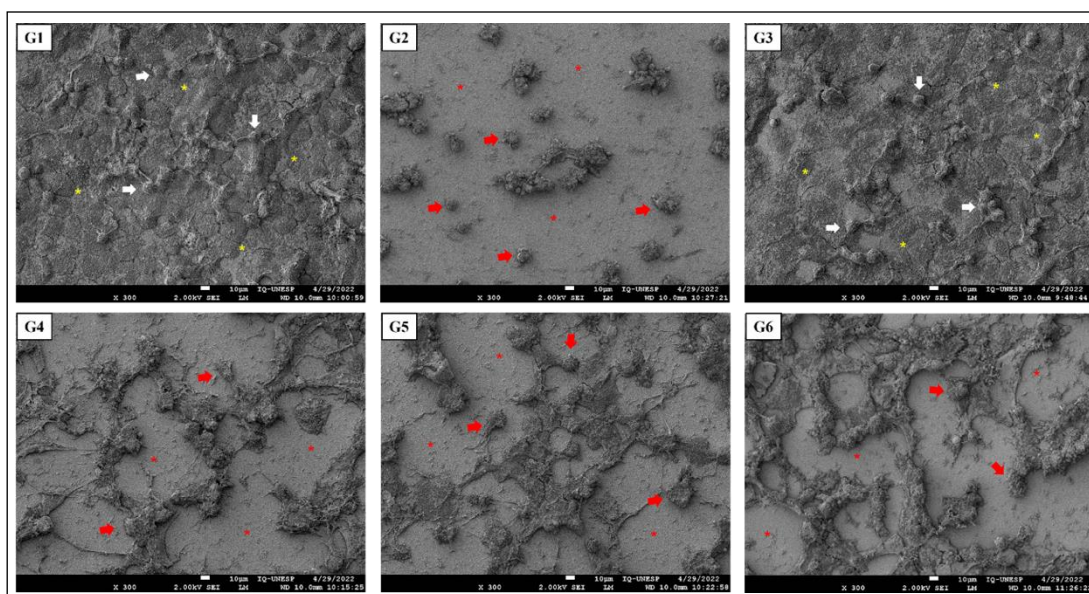
Análise do estresse oxidativo celular: Aumento significativo do estresse oxidativo foi observado em todos os grupos onde géis clareadores foram usados associados ou não ao SN+PPC+LEDv e do tempo de aplicação do gel clareador, em comparação a G1 (controle negativo) e G3 (SN+PPC+LED) (Figura 3C; $p < 0,05$). O maior valor de estresse oxidativo celular ocorreu em G2 (controle positivo; $p < 0,05$). O uso combinado de SN+PPC+LEDv e a manutenção do gel clareador por apenas 15 minutos sobre o esmalte (G6), reduziu significativamente o estresse oxidativo quando comparado aos demais grupos clareados ($p < 0,05$).

Figura 3. A - Análise de difusão de H_2O_2 ; B - Análise da citotoxicidade celular; C - Análise de estresse oxidativo. Barras representam valores médios e desvio-padrão. Números demonstram a média de cada grupo. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes (n=8; ANOVA/Tukey, =5%).



Avaliação da morfologia celular: A partir das imagens obtidas em MEV (Figura 4), foi possível determinar que a morfologia e quantidade de células aderidas ao substrato de vidro foram semelhantes entre os grupos onde géis clareadores não foram aplicados sobre o esmalte (G1 e G3). Nesses grupos, as células exibiam amplo citoplasma e numerosos prolongamentos citoplasmáticos originados de sua membrana. Redução no tamanho e número das células que permaneceram aderidas ao substrato de vidro ocorreu em todos os grupos clareados (G2, G4, G5 e G6) em comparação a G1 e G3. O revestimento do esmalte com SN+PPC e o uso do LEDv para irradiar o gel clareador foi determinante para manter um maior número de células aderidas ao substrato, independente do tempo de aplicação do produto. Entretanto, esse efeito foi ainda mais significativo em G6, onde as estratégias catalisadoras foram usadas e o gel clareador foi mantido sobre o esmalte por 15 minutos.

Figura 4. Análise da morfologia celular. MEV, x300. Em G1 e G3, células com amplo citoplasma, morfologia poligonal (seta branca) e prolongamentos originados de sua membrana eu citoplasma (asterisco amarelo) são observados sobre o substrato de vidro. Nos grupos clareados (G2, G4, G5 e G6), amplas áreas de substrato de vidro podem ser observadas (asterisco vermelho), visto que um reduzido número de células expostas aos extratos permaneceu aderidas. Estas células exibem importantes alterações morfológicas (setas vermelhas). Entre os grupos clareados, G6 foi aquele que apresentou maior número de células aderidas e com morfologia próxima da normalidade.



DISCUSSÃO

Estudos *in vivo* têm demonstrado os severos e irreversíveis danos para a polpa de dentes humanos causados pela difusão trans-amelodentinária de H_2O_2 liberado dos géis clareadores [16,25]. Esses efeitos pulpares adversos parecem estar diretamente relacionados com a concentração de H_2O_2 presente no gel clareador e de seu tempo de aplicação sobre o esmalte dentário [12,17]. Porém, mais recentemente foi demonstrado que a diminuição da concentração de 35% para 20% de H_2O_2 num gel clareador de consultório não preveniu a ocorrência de necrose parcial da polpa coronária, associada a deposição de dentina terciária e inflamação da polpa radicular [25]. A chegada de concentrações tóxicas de H_2O_2 no tecido pulpar tem sido relacionada com a reduzida capacidade desta molécula de interagir, e consequentemente degradar, pigmentos orgânicos depositados nos tecidos mineralizados do dente. Desta forma, o excesso de H_2O_2 não reagido (H_2O_2 -free) que se difunde pelo esmalte e dentina para alcançar a polpa gera estresse oxidativo nas células locais e causa peroxidação lipídica, resultando em danos celulares irreversíveis [26]. Por outro lado, alguns pesquisadores demonstraram que a associação de estratégias que aumentam a cinética de degradação da molécula de H_2O_2 presente nos géis clareadores, reduz a quantidade de H_2O_2 -free, o que causa significativa diminuição da

citotoxicidade da terapia clareadora de consultório [13,19-23]. As novas moléculas geradas pela degradação do H_2O_2 têm reduzido tempo de meia-vida e elevado potencial oxidativo, o que pode favorecer o resultado estético e reduzir a toxicidade da terapia [21-23]. Na presente investigação, foi observado que o uso da estratégia catalisadora - SN+PPC+LEDv acelerou a alteração de cor dos tecidos dentários escurecidos, o que permitiu alcançar eficácia estética em apenas 15 minutos de tratamento. A estratégia avaliada também reduziu a difusão trans-amelodentinária de H_2O_2 , minimizando os efeitos tóxicos do procedimento sobre as células pulpares. Dessa forma, a hipótese nula do presente estudo foi rejeitada.

O efeito positivo da utilização de catalisadores enzimáticos para degradar H_2O_2 presente nos géis clareadores tem sido demonstrado pelo aumento significativo da geração de radical hidroxila ($\text{HO}^\bullet$) [13,20,22]. Quando em contato com o H_2O_2 , a enzima peroxidase é capaz de reduzir a energia cinética necessária para que as moléculas iniciem a reação, aumentando a taxa de degradação do H_2O_2 . Consequentemente, uma grande quantidade de $\text{HO}^\bullet$ e outras moléculas reativas são geradas, as quais decompõem rapidamente pigmentos orgânicos presentes na estrutura dental [27,28]. Dentre os catalisadores químicos enzimáticos mais estudados, a enzima horseradish peroxidase (HRP) é um dos mais importantes, sendo obtida de fonte vegetal a partir da raiz da *Armoracia rusticana*; essa enzima apresenta um centro metálico Fe^{3+} na sua composição, o que favorece a cisão homolítica do H_2O_2 , em um processo semelhante a reação de Fenton [29-31]. Em adição, o LEDv parece ter um efeito positivo, especialmente na eficácia estética da terapia clareadora, podendo ser considerado um interessante coadjuvante nesse tipo de terapia [24]. O uso de biopolímeros, tais como o SN e o PPC, favorece a degradação do H_2O_2 , o que aumenta a eficácia estética da terapia clareadora e reduz sua citotoxicidade [13,22,23]. Desta forma, tornou-se possível sugerir o emprego de protocolos de clareamento dental de consultório inovadores, com potencial para reduzir o tempo de tratamento e os efeitos biológicos adversos deste tipo de terapia. No presente estudo, observou-se significativa alteração colorimétrica (ΔE_{00}) e do índice de clareamento (ΔWI) nos grupos onde se usou a estratégia combinada - SN+PPC+LEDv. Em G4 e G5, nos quais o gel foi aplicado por 45 ou 30 minutos, respectivamente sobre o esmalte, ocorreu aumento de aproximadamente 57% e 32% para ΔE_{00} e de 55% e 40% para ΔWI , respectivamente, em comparação ao protocolo convencional de clareamento de consultório (G2). Em G6, apesar do tempo de aplicação do gel clareador sobre o esmalte ter sido reduzido para apenas 15 minutos, a eficácia estética alcançada com o uso combinado da estratégia SN+PPC+LEDv foi estatisticamente semelhante a G2.

A análise da quantidade de H_2O_2 -free difundido pelo disco de esmalte/dentina é uma maneira indireta de determinar o grau de degradação do H_2O_2 presente no gel clareador. Os subprodutos gerados, tais como o radical hidroxila ($\text{HO}^\bullet$), peri-hidroxila ($\text{HO}_2^\bullet$) e superóxido ($\text{O}_2^\bullet$), são moléculas simples, altamente reativas e que apresentam reduzido tempo de meia-vida [32,33]. Considerando este fato, essas moléculas podem ser eliminadas do meio imediatamente após interagirem com os pigmentos presentes nos tecidos mineralizados do dente [34-36], prevenindo sua difusão trans-amelodentinária. Por outro lado, a falta de degradação da molécula de H_2O_2 , a qual tem limitada reatividade e longo tempo de meia-vida, permite com que ela consiga se difundir em concentrações tóxicas até o espaço pulpar. Assim, quanto maior a degradação do H_2O_2 presente nos géis clareadores, menor a citotoxicidade do produto e vice-versa. No presente estudo, o maior valor de difusão de H_2O_2 ocorreu em G2, o qual representou o clareamento convencional de consultório. O revestimento do esmalte com SN+PPC e o uso do LEDv para irradiar o gel clareador, aplicado por 45 (G4), 30 (G5) ou 15 minutos (G6), reduziu em aproximadamente 49%, 39% e 36%, respectivamente, a viabilidade celular em comparação a G2. Baseado no fato de que o uso da estratégia catalisadora - SN+PPC+LEDv não preveniu completamente os danos celulares em comparação a G1 (100% de metabolismo celular), é possível sugerir que a elevada concentração de H_2O_2 no gel clareador de consultório usado nesta pesquisa (35% H_2O_2) não permitiu a completa degradação desta molécula. Consequentemente, apesar do excelente resultado estético alcançado, um moderado efeito citotóxico ainda foi observado em G6, onde as células MDPC-23 apresentaram redução de viabilidade ocasionada pelo aumento de seu estresse oxidativo. Assim, futuros estudos são necessários para determinar os possíveis efeitos biológicos colaterais de géis clareadores com menores concentrações de H_2O_2 , quando usados em combinação com a estratégia catalisadora avaliada neste estudo (SN+PPC+LEDv).

Levando em consideração os interessantes e promissores dados científicos obtidos neste estudo, os quais podem direcionar o desenvolvimento de terapias clareadoras inovadoras mais biocompatíveis e rápidas, é importante reconhecer que os resultados de pesquisas *in vitro* não devem ser extrapolados de imediato para situações clínicas [13,21-24]. Isso porque dentes vitais exibem fatores que podem limitar a difusão trans-amelodentinária de H_2O_2 , tais como a pressão de exsudação do fluído dentinário e presença intra-tubular de colágeno e de prolongamentos citoplasmáticos dos odontoblastos. Desta maneira, além de avaliar o uso da estratégia catalisadora - SN+PPC+LEDv associada a géis clareadores menos concentrados, será

importante realizar pesquisas in vivo para determinar a efetividade estética e a segurança de uso clínico deste tipo de terapia profissional.

CONCLUSÃO

Foi possível concluir que a estratégia de irradiar com LEDv um gel clareador com 35% H_2O_2 , aplicado por apenas 15 minutos sobre o esmalte dentário previamente revestido com um scaffold de nanofibras e um primer polimérico catalisador (PPC), alcançou a eficácia estética e reduziu a citotoxicidade comumente causada pelo clareamento convencional de consultório.

REFERÊNCIAS

1. G.A. Maghaireh, H. Alzraikat, N.A. Taha, Satisfaction with dental appearance and attitude toward improving dental esthetics among patients attending a dental teaching center, *J. Contemp. Dent. Pract.* 17(1) (2016) 16-21. <https://10.5005/jp-journals-10024-1796>
2. A.V. Dourado Pinto, N.R. Carlos, F. Amaral, F.M.G. França, C.P. Turssi, R.T. Basting, At-home, in-office and combined dental bleaching techniques using hydrogen peroxide: Randomized clinical trial evaluation of effectiveness, clinical parameters and enamel mineral content, *Am. J. Dent.* 32(3) (2019) 124- 132
3. R. Pereira, J. Silveira, S. Dias, A. Cardoso, A. Mata, D. Marques, Bleaching efficacy and quality of life of different bleaching techniques—randomized controlled trial, *Clin. Oral. Investig.* 2022;1-11. <https://doi.org/10.1007/s00784-022-04678-5>
4. S.S. Meireles, M.L. Goettems, R.V.F. Dantas, A. Della Bona, I.S. Santos, F.F. Demarco, Changes in oral health related quality of life after dental bleaching in a double-blind randomized clinical trial, *J. Dent.* 42(2) (2014) 114-121. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2013.11.022>
5. L. Cavalcante, C. Bomgiovanni, K. Antunes, M. Cardoso, E. Loureiro, P. Tannure, L.F. Schneider, Color change, tooth sensitivity, aesthetic self-perceptions and quality of life after at-home dental bleaching, *Braz. Dent. Sci.* 25(1) (2022). <https://doi.org/10.4322/bds.2022.e2739>
6. M.Q. Alqahtani, Tooth-bleaching procedures and their controversial effects: A literature review, *Saudi. Dent. J.* 26(2) (2014) 33-46. <https://doi.org/10.1016/j.sdentj.2014.02.002>
7. B.M. Maran, T. de Paris Matos, A.D.S. de Castro, L. Vochikovski, A.L. Amadori, A.D. Loguercio, A. Reis, S.B. Berger, In-office bleaching with low/medium vs. high concentrate hydrogen peroxide: a systematic review and meta-analysis, *J. Dent.* 103 (2020) 103499. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2020.103499>

8. A.M. Kielbassa, M. Maier, A.K. Gieren, E. Eliav, Tooth sensitivity during and after vital tooth bleaching: a systematic review on an unsolved problem. *Quintessence. Int.* 46(10) (2015). <https://doi.org/10.3290/j.qi.a34700>
9. S.S. Meireles, M.E. Santos, I.M.C. Lustosa, E.L.L. Leite, Effects of a reduced in-office bleaching protocol with 37.5% hydrogen peroxide on effectiveness and tooth sensitivity: a double-blind randomized clinical trial, *J. Esthet. Restor. Dent.* 33 (5) (2021) 824–831, <https://doi.org/10.1111/jerd.12744>
10. M. Rezende, K.L. da Silva, T.C. Miguel, P.V. Farago, A.D. Loguercio, L.D. Martins, A. Reis, Prior application of 10% potassium nitrate to reduce postbleaching sensitivity: a randomized triple-blind clinical trial, *J. Evid. Based. Dent. Pract.* 20(2) (2020) 101406. <https://doi.org/10.1016/j.jebdp.2020.101406>
11. M. Rezende, A.D. Loguercio, S. Kossatz, A. Reis, Predictive factors on the efficacy and risk/intensity of tooth sensitivity of dental bleaching: a multi regression and logistic analysis, *J. Dent.* 45 (2016) 1–6, <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2015.11.003>.
12. D.G. Soares, F.G. Basso, J. Hebling, C.A. de Souza Costa, Concentrations of and application protocols for hydrogen peroxide bleaching gels: effects on pulp cell viability and whitening efficacy, *J. Dent.* 42(2) (2014) 185–198. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2013.10.021>
13. U. Ortecho-Zuta, C.C. de Oliveira Duque, R.A. de Oliveira Ribeiro, M.L. Leite, D.G. Soares, J. Hebling, A.L.F. Briso, C.A. de Souza Costa, Polymeric biomaterials maintained the esthetic efficacy and reduced the cytotoxicity of in-office dental bleaching, *J. Esthet. Restor. Dent.* 33 (2021) 1139–1149, <https://doi.org/10.1111/jerd.12805>
14. D.G. Soares, N. Marcomini, C.C.O. Duque, E.A.F. Bordini, U. Ortecho-Zuta, F. Basso, J. Hebling, C.A. de Souza Costa, Increased whitening efficacy and reduced cytotoxicity are achieved by the chemical activation of a highly concentrated hydrogen peroxide bleaching gel, *J. Appl. Oral. Sci.* 27 (2019), e20180453. <https://doi.org/10.1590/1678-7757-2018-0453>
15. D.G. Soares, F.G. Basso, J. Hebling, C.A. de Souza Costa, Effect of hydrogen peroxide-mediated oxidative stress on human dental pulp cells, *J. Dent.* 43(6) (2015) 750–756. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2014.12.006>
16. C.A. de Souza Costa, H. Riehl, J.F. Kina, N.T. Sacono, J. Hebling, Human pulp responses to in-office tooth bleaching, *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* 109 (4) (2010) e59–e64, <https://doi.org/10.1016/j.tripleo.2009.12.002>
17. D.G. Soares, F.G. Basso, J. Hebling, C.A. de Souza Costa, Immediate and late analysis of dental pulp stem cells viability after indirect exposition to alternative in-office bleaching strategies, *Clin. Oral. Investig.* 19 (2015) 1013–1020, <https://doi.org/10.1007/s00784-014-1321-3>
18. D.G. Soares, F.G. Basso, E.C. Pontes, L.D.F. Garcia, J. Hebling, C.A. de Souza Costa, Effective tooth-bleaching protocols capable of reducing H₂O₂ diffusion through enamel and dentine, *J. Dent.* 42 (2014) 351–358, <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2013.09.001>

19. C.C. de Oliveira Duque, D.G. Soares, F.G. Basso, J. Hebling, C.A. de Souza Costa, Influence of enamel/dentin thickness on the toxic and esthetic effects of experimental in-office bleaching protocols. *Clin Oral Investig.* 21 (2017) 2509-20. <https://doi.org/10.1007/s00784-017-2049-7>
20. R.A.O. Ribeiro, C.C. de Oliveira Duque, U. Ortecho-Zuta, M.L. Leite, J. Hebling, D.G. Soares, C.A. de Souza Costa, Influence of manganese oxide on the esthetic efficacy and toxicity caused by conventional in-office tooth bleaching therapy, *Oper. Dent.* 47(4) (2022) 425-436. <https://doi.org/10.2341/20-257-L>
21. R.A. de Oliveira Ribeiro, U.O. Zuta, I.P.M. Soares, C. Anselmi, D.G. Soares, A.L.F. Briso, J. Hebling, C.A. de Souza Costa, Manganese oxide increases bleaching efficacy and reduces the cytotoxicity of a 10% hydrogen peroxide bleaching gel, *Clin. Oral. Investig.* (2022) 1-10. <https://doi.org/10.1007/s00784-022-04688-3>
22. B.V. Martins, M.F. Dias, R.A. de Oliveira Ribeiro, M.L.D.A. Silva, J. Hebling, C. A. de Souza Costa, Innovative strategy for in-office tooth bleaching using violet LED and biopolymers as H₂O₂ catalysts, *Photodiagn. Photodyn. Ther.* (2022), 102886, <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2022.102886>
23. U. Ortecho-Zuta, C.C. de Oliveira Duque, R.A. de Oliveira Ribeiro, M.L. Leite, D.G. Soares, J. Hebling, A.L.F. Briso, C.A. de Souza Costa, Strategy for reducing cytotoxicity and obtaining esthetic efficacy with 15 min of in-office dental bleaching, *Clin. Oral. Investig.* 26(5) (2022) 4099-4108. <https://doi.org/10.1007/s00784-022-04379-z>
24. R.A.O. Ribeiro, V. Peruchi, L.O. Fernandes, C. Anselmi, I.P.M. Soares, J. Hebling, C.A. de Souza Costa, The influence of violet LED application time on the esthetic efficacy and cytotoxicity of a 35% H₂O₂ bleaching gel, *Photodiagn. Photodyn. Ther.* (2022) 103069. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2022.103069>
25. D.A. Roderjan, R. Stanislawczuk, D.G. Soares, C.A. de Souza Costa, M.W. Favoreto, A. Reis, A.D. Loguercio, Effect of medium or high concentrations of in-office dental bleaching gel on the human pulp response in the mandibular incisors, *Restor. Dent. Endod.* 48 (2023). <https://doi.org/10.5395/rde.2023.48.e12>
26. F.C. Marson, R.S. Gonçalves, C.O. Silva, L.T. Cintra, R.C. Pascotto, P.H. Santos, A.L. F. Briso, Penetration of hydrogen peroxide and degradation rate of different bleaching products, *Oper. Dent.* 40 (1) (2015) 72–79, <https://doi.org/10.2341/13-270-L>
27. S. Gopinath, V. James, S. Vidhya, K. Karthikeyan, S. Kavitha, S. Mahalaxmi, Effect of bleaching with two different concentrations of hydrogen peroxide containing sweet potato extract as an additive on human enamel: an in vitro spectrophotometric and scanning electron microscopy analysis, *J. Conserv. Dent.* 16 (2013) 45–49, <https://doi.org/10.1590/1678-7757-2018-0453>
28. A.C. Travassos, C.R. Torres, A.B. Borges, D.C. Barcellos, In vitro assessment of chemical activation efficiency during in office dental bleaching, *Oper. Dent.* 35 (2010) 8, <https://doi.org/10.2341/09-256-L>

29. G.I. Berglund, G.H. Carlsson, A.T. Smith, H. Szöke, A. Henriksen, J. Hajdu, The catalytic pathway of horseradish peroxidase at high resolution, *Nature*. 417(6887) (2002) 463-8. <https://doi.org/10.1038/417463a>
30. N.C. Veitch, Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme, *Phytochemistry*. 65(3) (2004) 249-59. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2003.10.022>
31. S. Sato, K. Nakamura, H. Nakamura, Horseradish-peroxidase-catalyzed tyrosine click reaction, *Chembiochem*. 18(5) (2017) 475-8. <https://doi.org/10.1002/cbic.201600649>
32. M. Khanmohammadi, M.B. Dastjerdi, A. Ai, A. Ahmadi, A. Godarzi, A. Rahimi, J. Ai, Horseradish peroxidase-catalyzed hydrogelation for biomedical applications, *Biomater Sci*. 6(6) (2018) 1-43. <https://doi.org/10.1039/C8BM00056E>
33. E. Gantumur, S. Sakai, M. Nkahata, M. Taya, Horseradish peroxidase-catalyzed hydrogelation consuming enzyme-produced hydrogen peroxide in the presence of reducing sugars, *Soft Matter*. 15(10) (2019) 2163–2169. <https://doi.org/10.1039/C8SM01839A>
34. K. Kawamoto, Y. Tsujimoto, Effects of the hydroxyl radical and hydrogen peroxide on tooth bleaching, *J. Endod*. 30(1) (2004) 45-50. <https://doi.org/10.1097/00004770-200401000-00010>
35. M. Goldberg, M. Grootveld, E. Lynch, Undesirable and adverse effects of tooth whitening products: a review, *Clin. Oral Investig*. 14 (1) (2010) 1–10. <https://doi.org/10.1007/s00784-009-0302-4>
36. C.M. Carey, Tooth whitening: what we now know, *J. Evid. Based Dent. Pract*. 14 (2014) 70–76. <https://doi.org/10.1016/j.jebdp.2014.02.006>

3.4 Publicação 4*

Avaliação da citocompatibilidade da estratégia clareadora inovadora em cultura 3D de células pulpaes humanas

RESUMO

O objetivo do estudo foi avaliar a influência de uma estratégia clareadora baseada no uso combinado de um scaffold de nanofibras (SN), um primer polimérico catalisador (PPC) contendo 10 mg/mL da enzima peroxidase e do LED violeta (LEDv), sobre a eficácia clareadora (EC), citocompatibilidade (CT) e modulação da expressão gênica de células pulpaes humanas (HDPCs) em cultura 3D. Discos de esmalte/dentina foram adaptados em câmaras pulpaes artificiais. Sobre o esmalte previamente recoberto com SN+PPC, foi aplicado por 15 minutos um gel clareador com 35% H_2O_2 , o qual foi irradiado por 15 minutos com LEDv. Os seguintes grupos foram estabelecidos (n=8): CN – sem tratamento (negative control); CP – 35% H_2O_2 /45min (positive control); e SN+PPC+ 35% H_2O_2 /15min+LEDv/15min. A EC (ΔE_{00} e ΔWID) e a CT (AlamarBlue) (ANOVA/Tukey), bem como a modulação dos genes envolvidos nos processos de inflamação (*TNF*, *IL1B*, *PTGS2*, *IL8*, *IL6*, *PPRAG* e *HMOX1*) e mineralização (*DSPP*, *DMP1*, *SPP1*, *BGLAP* e *ALPL*) (RT-qPCR) foram avaliados (ANOVA/Tukey; $\alpha=5\%$). Na EC, não houve diferença estatística entre CP e H_2O_2 +SN+PPC+LED ($p>0,05$) para ambas as equações. Maior viabilidade e menor nível de estresse oxidativo (sonda carboxy- H_2DCFDA) ocorreu nas células em H_2O_2 +SN+PPC+LED quando comparado ao CP ($p<0,05$). Foi observado que em H_2O_2 +SN+PPC+LED existe menor expressão de marcadores inflamatórios, além de regular positivamente a expressão de marcadores para mineralização quando comparado a CP ($p<0,05$). O revestimento do esmalte com SN+PPC e irradiação do gel clareador com LEDv promove alteração cromática nos tecidos dentários semelhante ao protocolo tradicional de clareamento de consultório e com menor efeito colateral para as células pulpaes.

* Artigo formatado segundo as normas de publicação do periódico *Dental Materials* para o qual foi submetido.

INTRODUÇÃO

Vários fatores, como a concentração de H_2O_2 no gel clareador e seu tempo de aplicação, bem como a espessura do esmalte/dentina e a presença de pigmentos nos tecidos dentários, podem influenciar a difusão de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) até o tecido pulpar (Soares et al., 2014; de Oliveira Duque et al., 2017, 2020). Estudos demonstraram que o contato do H_2O_2 com células pulpares resulta em estresse oxidativo, danos à membrana celular e aumento na produção de mediadores inflamatórios, levando à morte celular em uma relação de dose-dependência (Soares et al., 2014, 2015, 2019; Ortecho-Zuta et al., 2021). Pesquisas realizadas em dentes humanos, os quais foram clareados e posteriormente avaliados microscopicamente, mostraram a ocorrência de inflamação e necrose parcial do tecido pulpar (Costa et al., 2010; Roderjan et al., 2015, 2023). Nestes estudos, quase a totalidade dos pacientes relataram sensibilidade dentária pós-clareamento (SC).

Com o objetivo de evitar a chegada na polpa de quantidade de H_2O_2 capaz de causar intenso dano tecidual e a consequente SC, pesquisadores têm proposto e avaliado novos protocolos de clareamento de consultório, empregando diferentes modalidades de catálise do H_2O_2 (Soares et al., 2019, Ortecho-Zuta et al., 2021; de Oliveira Ribeiro et al., 2024). A degradação do H_2O_2 por agentes catalisadores gera a formação de moléculas altamente oxidativas, as quais apresentam vida útil reduzida. Entre esses catalisadores, a enzima peroxidase hêmica (HRP) mostrou potencial para aumentar a eficácia do clareamento e reduzir a citotoxicidade em células odontoblastóides in vitro (Soares et al., 2019, Ortecho-Zuta et al., 2021; de Oliveira Ribeiro et al., 2024). Enquanto catalisadores baseados na reação de Fenton produzem muitas bolhas e subprodutos coloridos, a HRP resulta numa reação oxidativa controlada e sem formação de subprodutos indesejados, fruto da interação do H_2O_2 e o centro metálico de Fe^{3+} da enzima HRP (Sato et al., 2017).

Recentemente, de Oliveira Ribeiro et al. (2024) propuseram o uso da hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) como carreador da enzima HRP e de scaffolds de nanofibras à base de policaprolactona (PCL) para revestir o esmalte antes da aplicação do gel clareador. A catálise química do H_2O_2 promovida pelos biopolímeros, combinada com a fotocatálise causada pela irradiação do gel clareador com LED violeta (LEDv) otimizou a alteração de cor e reduziu a citotoxicidade desta modalidade de terapia estética. O efeito tóxico trans-amelodentinário da terapia foi avaliado num modelo de câmara pulpar artificial (CPA), onde extratos (meio de cultura + componentes do gel clareador que se difundiram pelo esmalte

e dentina) foram coletados e então aplicados sobre uma monocamada de células odontoblastóides previamente estabelecida.

Seria importante, neste momento, avaliar os efeitos de novas estratégias clareadoras, usando para isso modelos laboratoriais ainda mais próximos das condições fisiológicas do complexo dentino-pulpar, permitindo simular condições clínicas, mimetizando dentes in vivo. Numa pesquisa recente, Soares et al. (2021) mostraram a viabilidade de estabelecer cultura tridimensional (3D) de células pulpare humanas em matriz de colágeno dentro da câmara pulpar artificial (CPA), reproduzindo o ambiente pulpar in vitro. Esse modelo laboratorial possibilita avaliar a citotoxicidade trans-amelodentinária imediata causada pelo tratamento e o potencial de recuperação das células com o decorrer do tempo. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar se a estratégia de combinar catálise química (revestimento do esmalte com SN + PPC) e fotocatalise (irradiação do gel clareador com LEDv) podem influenciar a eficácia clareadora (EC), citocompatibilidade (CT) e expressão gênica de células pulpare humanas (HDPCs) cultivadas num modelo de cultura 3D adaptada num modelo realista de CPA.

MATERIAIS E MÉTODOS

1.1 Cálculo do tamanho da amostra: O número de réplicas biológicas para as variáveis "eficácia clareadora", "citotoxicidade" e "expressão gênica" foi calculado usando o software G*Power (versão 3.1; University Dusseldorf, Dusseldorf, Alemanha). Foi definido um poder do teste de 0,80 e uma probabilidade de erro α de 0,05. O tamanho do efeito para eficácia clareadora foi de 4,03, para citotoxicidade trans-amelodentinária foi de 3,35 e para expressão gênica foi de 4,75. O tamanho estimado de amostra foi de 8 espécimes/grupo para todas as variáveis de resposta. Cada protocolo foi repetido em dois experimentos separados para garantir a reprodutibilidade dos resultados.

1.2 Formulação do Scaffold de Nanofibras (SN; n=8): Foi preparada uma solução de 12,5% de poli-caprolactona (PCL; Sigma-Aldrich) com clorofórmio/dimetilformamida (80:20) (Labsynth Produtos para laboratório, São Paulo, SP, Brasil) sob agitação magnética constante overnight. A solução foi transferida para uma seringa de 5 mL com agulha de aço inoxidável de calibre 18 e injetada automaticamente a 5 mL/h. Foi utilizada uma voltagem de 12 kV e uma distância de 15 cm entre a agulha e o coletor plano (de Oliveira Ribeiro et al., 2024).

1.3 Formulação do Primer Polimérico Catalisador (PPC; n=8): O hidroxipropil metilcelulose (HPMC, Sheffcel, Kerry; Beloit, WI, EUA) (1 g) na viscosidade de 100 mPa.s. foi diluído em

H₂O (10 mL) para obter uma solução a 10%. O gel preparado sob agitação magnética por 6 h em temperatura ambiente, foi então armazenado na geladeira por 24 h. A enzima peroxidase hêmica (HRP; Sigma-Aldrich) foi incorporada (10 mg/mL) na solução de HPMC como agente catalisador, dando origem ao PPC (Martins et al., 2022; Ortecho-Zuta et al., 2022 de Oliveira Ribeiro et al., 2024).

1.4 Obtenção e padronização dos discos de esmalte e dentina: Vinte e quatro discos de esmalte/dentina foram obtidos de incisivos bovinos íntegros, por meio do uso de uma broca diamantada do tipo trefina (Dinser brocas diamantadas Ltda., São Paulo, SP, Brasil) acoplada a uma furadeira de bancada (FSB 16 Pratika, Schül tz, Joinville, SC, Brasil). A superfície dentinária foi regularizada até obter-se espessura padronizada de 2,3 mm de esmalte/dentina simulando a espessura de incisivos inferiores (Martins et al., 2022; Ortecho-Zuta et al., 2022 de Oliveira Ribeiro et al., 2024).

1.5 Avaliação da eficácia clareadora (n=8): Os discos de esmalte/dentina manchados com chá-preto (de Oliveira Ribeiro et al., 2024) foram distribuídos em grupos (Tabela 1). No grupo H₂O₂+SN+PPC+LED, o esmalte foi coberto com SN e 10 µL de PPC foram aplicados sobre ele. Em seguida, o gel clareador foi irradiado com LED Violeta (MMOptics, São Carlos, SP, Brasil) por 15 minutos (Figura 1). A eficácia clareadora foi avaliada por espectrofotometria de reflexão UV (Espectrofotômetro de Reflexão ML Color Guide, BYK Gardner GmbH Geretsried, Alemanha), medindo os valores de L*a*b* antes (baseline) e 72 horas após os procedimentos, para avaliar a alteração de cor (CIEDE 2000, ΔE00) e o índice de clareamento (ΔWID) foi determinado conforme equações:

1)	$\sqrt{\left(\frac{\Delta L'}{k_L S_L}\right)^2 + \left(\frac{\Delta C'}{k_C S_C}\right)^2 + \left(\frac{\Delta H'}{k_H S_H}\right)^2} + R_T \frac{\Delta C'}{k_C S_C} \frac{\Delta H'}{k_H S_H}$
2)	$WI_D = 0,511L^* - 2,3424a^* - 1,100b^*$
3)	$\Delta WI_D = WI_D - WI_{Dbaseline}$

Tabela 1. Distribuição dos grupos controles e experimentais.

GRUPOS	GEL CLAREADOR	SN+PPC+LEDv	PROTOCOLO
CN (Controle Negativo)	-	-	Nenhum tratamento realizado
CP (Controle Positivo)	X	-	Gel clareador comercial (Whiteness HP, FGM) aplicado por 45 minutos
SN+PPC+ 35% H_2O_2 /15min+LEDv/15min	X	X	Revestimento do esmalte com o SN + PPC, seguido da aplicação do gel clareador (Whiteness HP, FGM) e irradiação com o LEDv.

2 Citotoxicidade trans-amelodentinária

2.1 Cultura de Células hDPCs: Após aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CAAE: 77373824.6.0000.5416), quatro terceiros molares íntegros foram obtidos de voluntários de ambos os sexos, com faixa etária entre 15 e 25 anos. Após extração, os dentes foram acondicionados imediatamente em meio de cultura Alpha-Modified Eagle's Medium (α MEM, Gibco – REF 11900-024 10x1 L) suplementado com 100 U/mL penicillina, 100 g/mL estreptomicina e 0,25 μ g/mL Fungizone (Gibco). A porção coronária foi mecanicamente separada da radicular, expondo o tecido pulpar. Com auxílio de limas endodônticas n° 10 esterilizadas (Maillefer Instruments, Ballaigues, Suíça), o tecido pulpar foi coletado, picotado com lâmina de bisturi n° 15 (Maxicor, Pinhais, PR, Brasil), sendo que os fragmentos da polpa foram transferidos para garrafas de cultura de 25 cm² (Kasvi) contendo 5 mL de α MEM (Gibco) suplementado com 10% de SFB, 100 IU/mL de penicilina (Gibco), 100 μ g/mL de estreptomicina (Gibco), 2 mmol/L de glutamina (Gibco) e 200 units/mL de collagenase Tipo I (Worthington Biochemical Corporation, Lakewood, NJ, EUA). Após 24 horas, as células pulpares que se desprenderam dos fragmentos e se aderiram ao fundo dos frascos foram tripsinizadas (Trypsina 0,25%, Gibco) e subcultivadas em α -MEM suplementado com 10% de SFB. Células entre a 3^a e 7^a passagens foram utilizadas no estudo.

2.2 Estabelecimento da cultura 3D: O arcabouço para a cultura celular foi obtido através da mistura de 200 μ L colágeno tipo 1 (Rat Tail Collagen Type I Solution; Sigma Aldrich), 40 μ L meio de cultura α MEM 10x (DMEM; GIBCO, Grand Island, NY, EUA) e 1 μ L de hidróxido de sódio [5M] (NaOH). A solução resultante foi transferida para placas de 48 compartimentos e incubadas a 37°C para geleificação por 30 minutos. Em seguida, 3x10⁴ células foram

semeadas sobre o arcabouço 3D, sendo os conjuntos incubados por 48 horas para crescimento das células no interior da cultura 3D.

2.3 Procedimento Experimental: Os discos de esmalte/dentina foram inseridos em câmaras pulpares artificiais (CPAs), fixados com anéis de silicone e esterilizados em óxido de etileno (Acecil, Central de Esterilização Comércio e Indústria LTDA, Campinas, SP, Brasil). Cada conjunto foi posicionado individualmente em placas de 24 compartimentos (KASVI Imp.). A cultura 3D foi transferida para o interior da CPA para garantir contato íntimo com a superfície de dentina (Figura 1), enquanto os procedimentos de clareamento foram realizados na superfície de esmalte. Após isso, a cultura 3D foi coletada para análises biológicas.

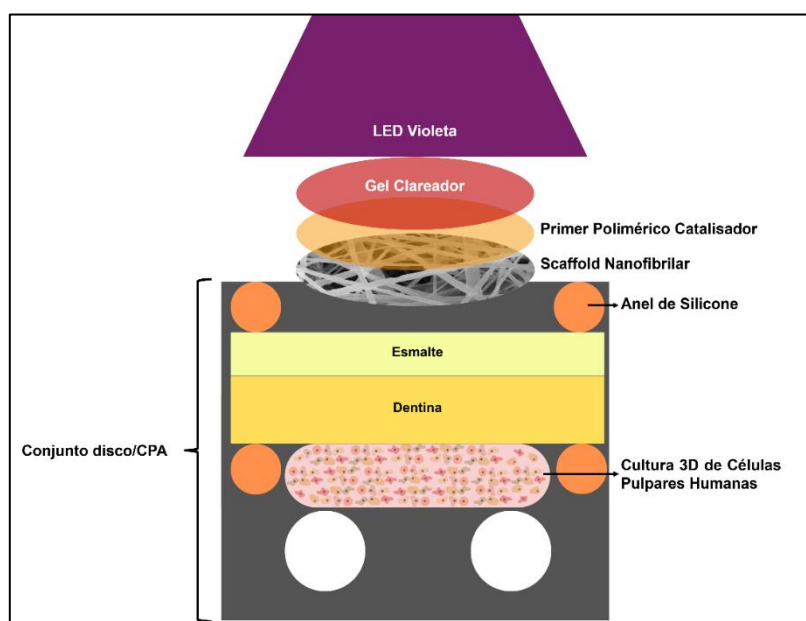


Figura 1. Representação esquemática do conjunto disco/CPA com a aplicação do grupo H_2O_2 +SN+PPC+LED.

2.4 Quantificação do H_2O_2 nos extratos ($n=8$): Aliquotas de 100 μ L do meio de cultura em contato com a dentina/cultura 3D foram transferidas para tubos plásticos de 5 mL (KASVI Imp.) contendo 900 μ L de solução tampão acetato (2 mol/L; pH 4,5). Em seguida, 500 μ L desta solução foi transferido para novos tubos plásticos de 5 mL (KASVI Imp.) contendo água e corante violeta leucocristal (0,5 mg/mL, Sigma-Aldrich). Os tubos foram agitados em vortex e 50 μ L de solução de 1 mg/mL da enzima horseradish peroxidase (Sigma-Aldrich) foi adicionada. A absorbância das soluções foi medida em espectrofotômetro (Synergy H1) com comprimento de onda de 596 nm (Martins et al., 2022; Ortecho-Zuta et al., 2022 de Oliveira Ribeiro et al., 2024).

2.5 Análise do estresse oxidativo celular (n=8): Para isto, as culturas foram previamente expostas por 30 min à sonda carboxy-H2DCFDA (Invitrogen, San Francisco, CA, EUA) na concentração de 10 µg/mL. Imediatamente após o clareamento, as culturas foram transferidas para placas de 48 compartimentos imersas em αMEM sem SFB, e a intensidade de fluorescência foi avaliada a 592 nm excitação e 517 nm emissão (Synergy H1) (Martins et al., 2022; Ortecho-Zuta et al., 2022 de Oliveira Ribeiro et al., 2024).

2.6 Avaliação da viabilidade celular (Teste de alamarBlue, n=8/Live/Dead, n=4): As culturas 3D foram coletadas imediatamente e 7 dias após o clareamento, e foram incubadas em uma solução contendo alamarBlue (Life Technologies; Grand Island, NY, EUA) por 4 horas. A absorbância foi medida a 570 nm em um espectrofotômetro (Synergy H1, Biotek, Winooski, EUA) (Martins et al., 2022; Ortecho-Zuta et al., 2022; de Oliveira Ribeiro et al., 2024). O ensaio de Live/Dead foi conduzido com o kit Live/Dead Cell Viability/Cytotoxicity (Invitrogen, San Francisco, CA, EUA), utilizando Ethyl homodimer-1 (Eth-1) para células com membrana celular comprometida (vermelho) e Calcein AM (CA) para células viáveis (verde) (de Oliveira Ribeiro et al., 2022). As culturas foram analisadas em microscópio de fluorescência (Leica DM 5500B, Nussloch GmbH, Nussloch, Germany).

2.7 Análise da expressão gênica (n=8): Imediatamente e 7 dias após a aplicação dos protocolos, o RNA total foi extraído utilizando o protocolo do reagente TRIzol (Invitrogen) seguido de tratamento com DNase (Sigma-Aldrich). Em seguida, 500 µg de RNA purificado foram utilizados como modelo para a síntese de DNA complementar da primeira fita usando o kit de transcrição reversa de cDNA de alta capacidade (Applied Biosystems, Life Technologies, Foster City, CA, EUA). Reações em cadeia da polimerase em tempo real foram conduzidas usando ensaios de expressão gênica TaqMan (Applied Biosystems) para amplificar *DSPP* (Hs00171962_m1), *DMP1* (Hs01009391_g1), *TNF* (Hs00174128_m1), *IL1B* (Hs01555410_m1), *PTGS2* (Hs00153133_m1), *IL6* (Hs00174131_m1), *IL8* (Hs_00174103_m1), *TRPA1* (Hs00175798_m1), *PPRAG* (Hs00234592_m1), *HMOX1* (Hs01110250_m1) imediatamente e *DSPP*, *DMP1*, *SPP1* (Hs00959010_m1), *BGLAP* (Hs01587814_g1) e *ALPL* (Hs01029144_m1) após 7 dias. As reações seguiram as condições TaqMan Fast Advanced Master Mix (Applied Biosystems) processadas no sistema StepOnePlus (Applied Biosystems). A expressão relativa (mudança de dobra) para cada gene foi calculada usando equações $2^{-\Delta\Delta C_q}$ com *GAPDH* (Hs02786624_g1) como gene de referência (Mendes Soares et al., 2023).

3 Análise estatística: Os dados foram analisados quanto à normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk e quanto à homogeneidade de variâncias pelo teste de Levene. Para eficácia clareadora, estresse oxidativo e expressão gênica, foi utilizada análise de variância de um critério (One-Way ANOVA), seguida pelo pós-teste de Tukey. A viabilidade celular foi analisada com análise de variância de medidas repetidas (RM-ANOVA), seguida pelo pós-teste de Sidak para avaliar as mesmas amostras ao longo do tempo. A difusão de H_2O_2 foi analisada pelo teste t de Student. Todas as análises estatísticas foram realizadas com um nível de significância de 5% (IBM SPSS Statistics for Windows, Version 25.0, Armonk, NY).

RESULTADOS

Análises de cor: Nas análises de cor, utilizando as fórmulas do ΔE_{00} (Fig. 2A) e do ΔWI_D (Fig. 2B), foi possível observar que ambos os grupos clareados foram estatisticamente diferentes do CN ($p < 0.0001$). O grupo SN+PPC+35% H_2O_2 /15min+LEDv/15min apresentou resultado semelhante ao CP ($p > 0.05$) para ambas as equações de alteração de cor.

Difusão do free- H_2O_2 e ensaios de citotoxicidade: Os valores de difusão de free- H_2O_2 no grupo SN+PPC+35% H_2O_2 /15min+LEDv/15min foram inferiores ao CP ($p < 0.0001$; (Fig. 2C). Menor estresse oxidativo ocorreu no grupo SN+PPC+35% H_2O_2 /15min+LEDv/15min em comparação com o CP ($p < 0.0001$) (Fig. 2D), sendo que este último apresentou os menores índices de viabilidade celular em ambos os períodos ($p < 0.005$; Fig. 2E). Quando comparado ao CN, a redução percentual da viabilidade celular em CP e SN+PPC+35% H_2O_2 /15min+LEDv/15min foi de 47,7% e 19,4%, respectivamente. Em SN+PPC+35% H_2O_2 /15min+LEDv/15min, a viabilidade das células aumentou em torno de 3 vezes entre os períodos de análise (imediato e 7 dias), tal como observado no CN. Por outro lado, discreto aumento na viabilidade celular (em torno de 1,3 vezes) foi observado no grupo CP (Fig. 2E).

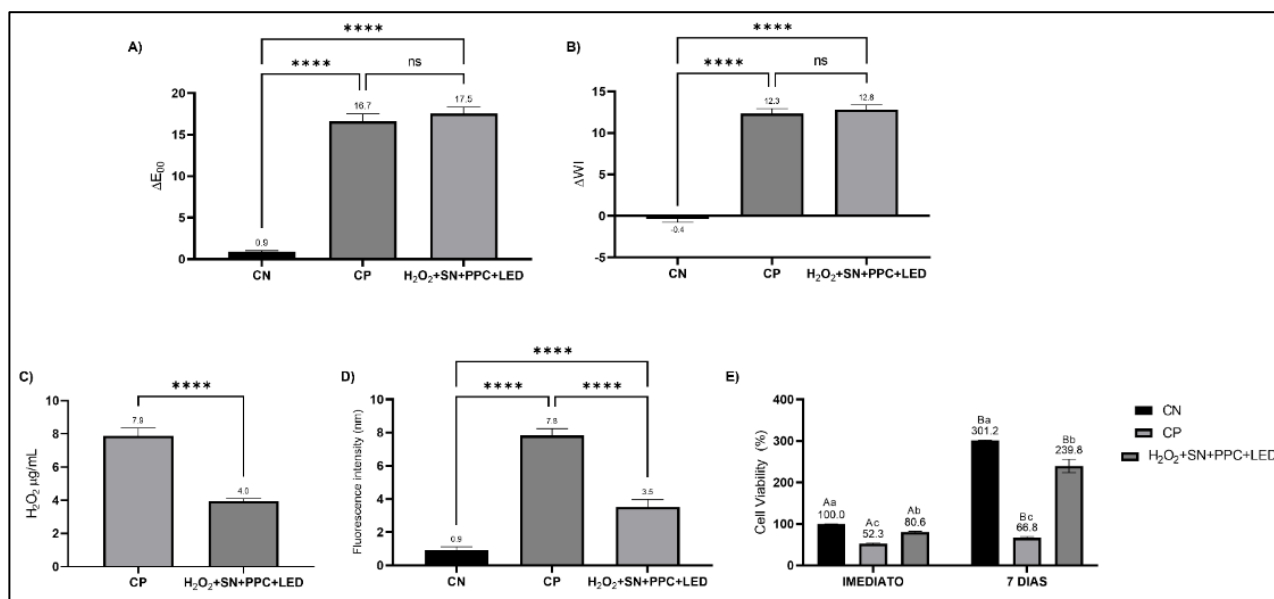


Figura 2. (A) Valores de ΔE_{00} (ANOVA/Tukey, $\alpha=5\%$), (B) Valores de ΔWI_D (ANOVA/Tukey, $\alpha=5\%$), (C) Quantificação do H_2O_2 nos extratos (teste t Student, $\alpha=5\%$), (D) Análise do estresse oxidativo celular (ANOVA/Tukey, $\alpha=5\%$), (E) Análise da viabilidade celular (ANOVA-RM/Sidak, $\alpha=5\%$). Barras representam valores médios e desvio-padrão. Asteriscos mostram diferença estatística (*= $p<0.05$; **= $p<0.01$; ***= $p<0.001$; ****= $p<0,0001$) para teste t Student e ANOVA/Tukey. Letras maiúsculas diferentes mostram diferença estatística do mesmo grupo ao longo dos períodos de análise, letras minúsculas diferentes mostram diferença estatística entre os grupos dentro do mesmo período de análise para ANOVA-RM/Sidak.

O ensaio de Live/Dead mostrou que as células de ambos os grupos clareados tiveram aumento na marcação positiva para EthD-1 (vermelho) em comparação ao CN (Fig. 3). Porém, menor quantidade de células marcadas para EthD-1 no arcabouço 3D foi observado no grupo SN+PPC+35% H_2O_2 /15min+LEDv/15min quando comparado ao CP (Fig. 3). Após 7 dias, houve redução na quantidade de células marcadas em vermelho para ambos os grupos clareados, sendo essa mais expressiva em SN+PPC+35% H_2O_2 /15min+LEDv/15min. (Fig. 3).

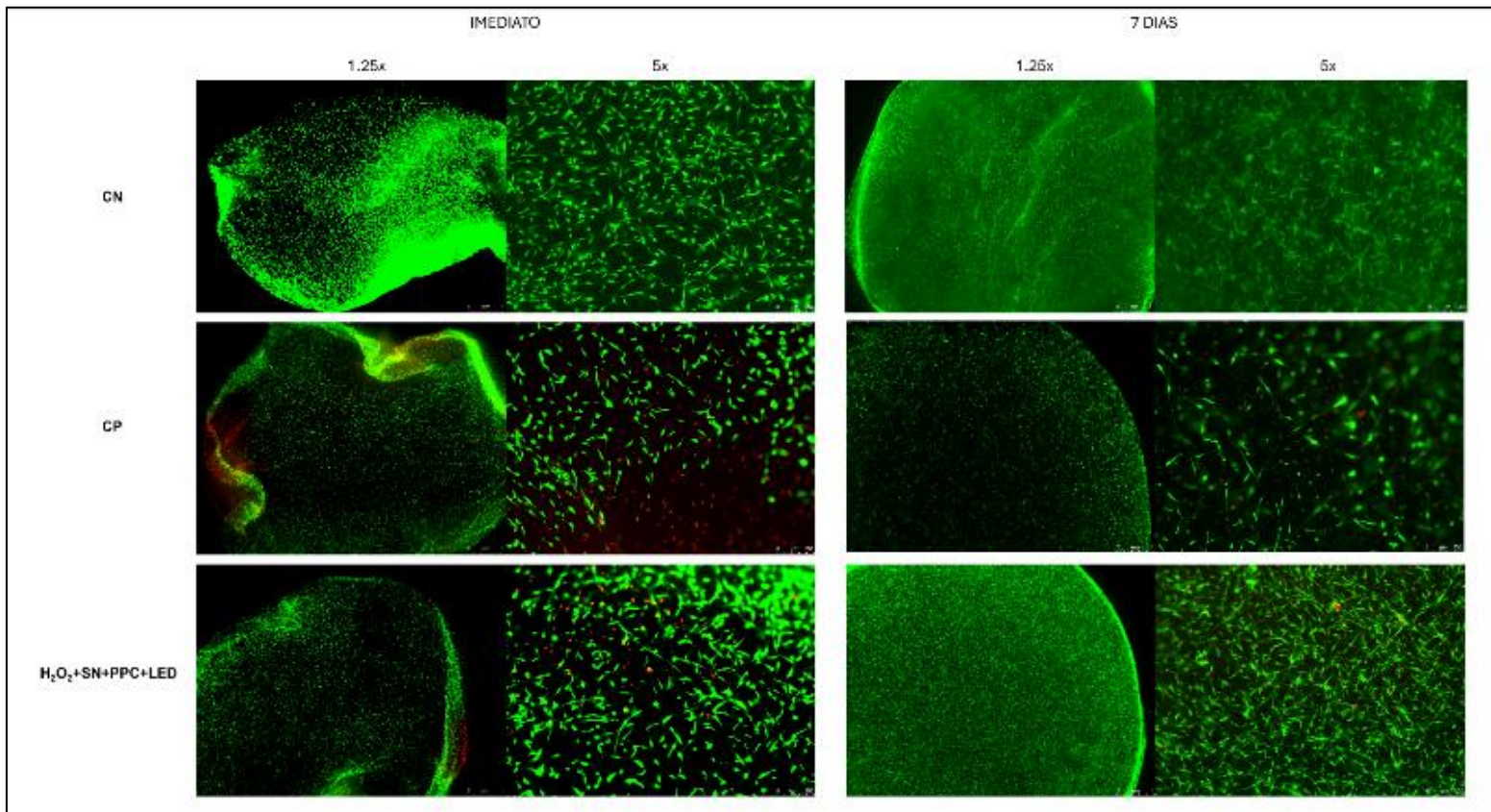


Figura 3. Ensaio de Live/Dead. Imagens da microscopia de fluorescência do ensaio de Live/Dead (1,25x e 5x). Nas imagens de microscopia as células coradas em verde (Calcein AM) se apresentam viáveis e as células coradas em vermelho (EthD-1) se apresentam em processo de morte celular.

Expressão gênica: Os resultados de expressão gênica para marcadores odontogênicos (*DSPP* e *DMP1*) e citocinas (*TNF*, *IL1B*, *PTGS2*, *IL6* e *IL8*) imediatamente após o clareamento estão apresentados na Fig. 4. *DSPP* e *DMP1* foram negativamente regulados em ambos os grupos clareados quando comparados ao CN ($p \leq 0.01$). *TNF*, *IL1B*, *PTGS2*, *IL6* e *IL8* foram regulados positivamente em ambos os grupos clareados em relação ao CN ($p \leq 0.05$). Entretanto, o fold increase em SN+PPC+35% H_2O_2 /15min+LEDv/15min foi significativamente inferior ao CP ($p \leq 0.05$). Efeito similar foi observado para os genes *TRPA1*, *PPARG* e *HMOX1* (Figura 5), os quais foram regulados positivamente nos grupos clareados em comparação ao CN ($p \leq 0.05$); porém, a expressão estes genes foi estatisticamente menor em SN+PPC+35% H_2O_2 /15min+LEDv/15min quando comparado ao CP ($p \leq 0.001$).

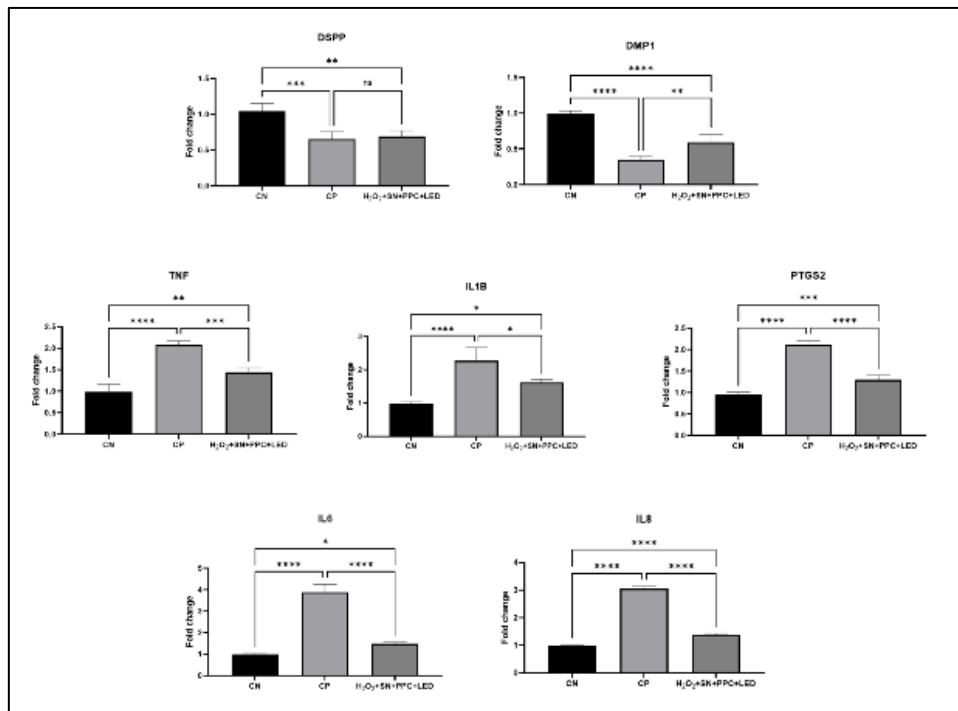


Figura 4. Expressão gênica (fold change em relação ao CN) de marcadores odontogênicos (*DSPP* e *DMP1*) e citocinas (*TNF*, *IL1B*, *PTGS2*, *IL6* e *IL8*) (ANOVA/Tukey, $\alpha=5\%$). Asteriscos mostram diferença estatística (*= $p<0.05$; **= $p<0.01$; ***= $p<0.001$; ****= $p<0.0001$).

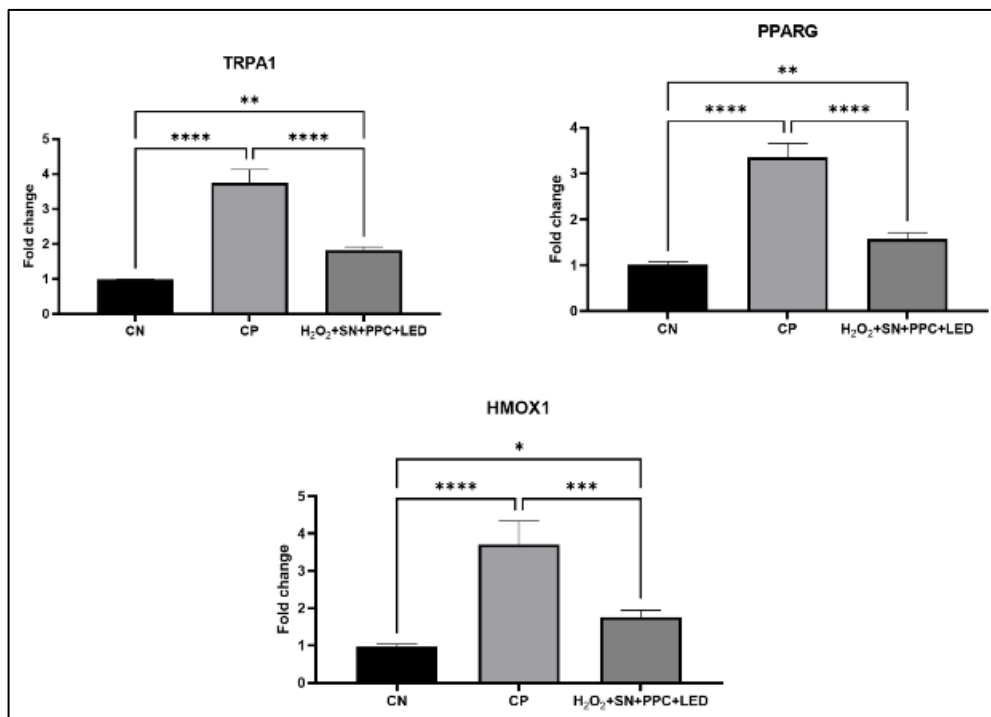


Figura 5. Expressão gênica (fold change em relação ao CN) de hiperalgesia (*TRPA1*) e regulação do estresse oxidativo (*PPARG* e *HMOX1*) (ANOVA/Tukey, $\alpha=5\%$). Asteriscos mostram diferença estatística (*= $p<0.05$; **= $p<0.01$; ***= $p<0.001$; ****= $p<0.0001$).

Regulação positiva de *DSPP* e *DMP1* no período de 7 dias ocorreu no grupo SN+PPC+35% H_2O_2 /15min+LEDv/15min em comparação aos grupos CP e CN ($p<0.0001$; Fig. 6). Os menores valores de expressão gênica de *DSPP* e *DMP1* foi observado no grupo CP ($p\leq 0.01$). A expressão dos genes *SPP1* e *BGLAP* foi aumentada em CP quando comparada aos demais grupos ($p\leq 0.001$). Porém, a expressão de *ALPL* foi reduzida no CP em comparação aos grupos SN+PPC+35% H_2O_2 /15min+LEDv/15min ($p\leq 0,05$), os quais foram estatisticamente semelhantes e ter si ($p>0,05$).

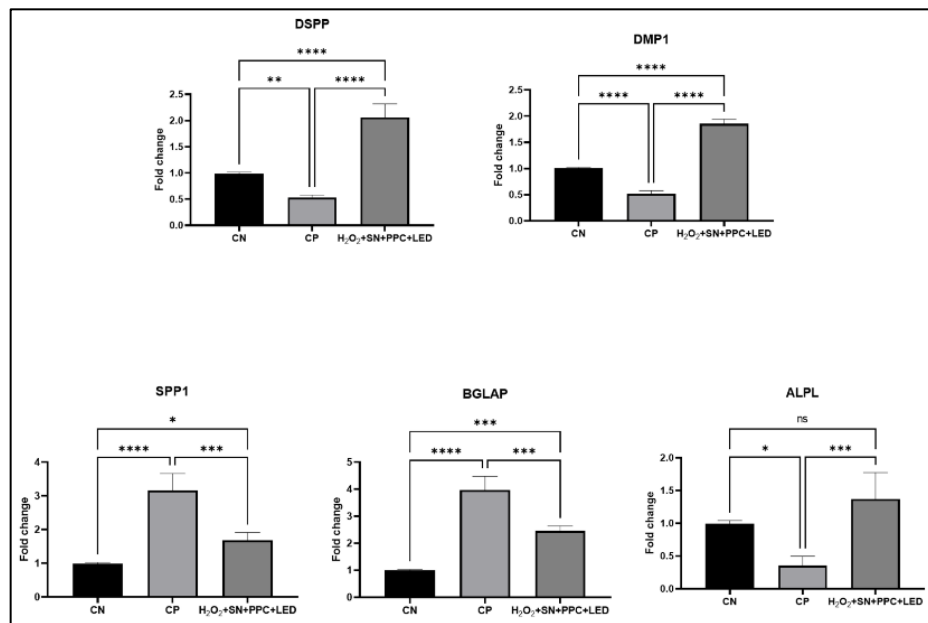


Figura 6. Expressão gênica (fold change em relação ao CN) de marcadores odontogênicos (*DSPP* e *DMP1*) e de mineralização (*SPP1*, *BGLAP* e *ALPL*) (ANOVA/Tukey, $\alpha=5\%$). Asteriscos mostram diferença estatística (*= $p<0.05$; **= $p<0.01$; ***= $p<0.001$; ****= $p<0.0001$).

DISCUSSÃO

O presente estudo investigou a eficácia estética e os efeitos citotóxicos de uma nova estratégia de clareamento dental, usando para isso um modelo laboratorial que mimetiza o complexo dentina-polpa. Em cada sessão de clareamento dental convencional de consultório, um gel com elevada concentração H_2O_2 é aplicado por 30-45 minutos sobre o esmalte. No presente estudo, um gel clareador com 35% H_2O_2 , aplicado por 45 minutos sobre o esmalte foi usado como controle positivo (CP). Neste grupo, ocorreu elevado efeito citotóxico imediato, sendo que este efeito colateral foi reduzido com o decorrer do tempo, permitindo a proliferação das células pulpares, as quais aumentaram sua viabilidade no período de 7 dias. A estratégia de revestir o esmalte com SN+PP antes da aplicação e irradiação (15 minutos) do gel clareador com LED violeta apresentou eficácia estética semelhante ao clareamento dental convencional de

consultório. Todavia, esta terapia experimental reduziu a difusão trans-amelodentinária de free- H_2O_2 , o que diminuiu o estresse oxidativo celular e seus efeitos tóxicos sobre células pulpares.

No presente estudo, aumento da expressão dos marcados pró-inflamatórios (*TNF*, *IL1B*, *PTGS2*, *IL6* e *IL8*) foi observado em ambos os grupos clareados, porém de maneira mais significativa no grupo CP. Já foi demonstrado que eventos vasculares/celulares decorrentes do aumento da expressão de mediadores pró-inflamatórios na polpa, resultam em liberação local de substância P (SP) e do peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) (Caviedes-Bucheli et al., 2008). Desta forma, o processo inflamatório do tecido pulpar desempenha papel importante na sensibilidade dentária pós clareamento de consultório, o que tem sido frequentemente relatado por pacientes submetidos a esta terapia estética (Rezende et al., 2020; Meireles et al., 2021). Alguns pesquisadores relataram que a dor provocada pelo contato H_2O_2 está diretamente ligada à ativação do receptor transitório anquirina 1 (*TRPA1*) (Trevisan et al., 2014; Chen et al., 2021). O *TRPA1* é um canal de cátions não seletivo encontrado principalmente em neurônios nociceptivos, podendo ser ativado por estímulos como frio intenso, espécies reativas derivadas do oxigênio (EROs) e forças mecânicas (Sun et al., 2016; Viana, 2016). Esses dados científicos indicam o envolvimento combinado de EROs e *TRPA1* na ativação dos nociceptores diante de concentrações elevadas de H_2O_2 . Assim, sugere-se que EROs, tais como o H_2O_2 , podem estimular ou sensibilizar nociceptores pulpares, incluindo *TRPA1*, desencadeando sensibilidade pós clareamento, a qual tem sido amplamente demonstrada quando da realização do clareamento dental convencional de consultório (Roderjan et al., 2015, 2023).

HMOX1 codifica a enzima heme oxigenase 1, enquanto *PPARG* é um fator transcricional que pertence à família de receptores nucleares ativados por ligantes (Kota et al., 2005). Em resposta à exposição ao H_2O_2 , a expressão de *HMOX1* é considerada uma defesa celular contra os efeitos citotóxicos, protegendo as células do aumento das EROs (Min et al., 2008). *PPARG*, por sua vez, aumenta a atividade de superóxido dismutase, reduzindo as espécies reativas de oxigênio celulares (Lee et al., 2013), sendo essencial para a sobrevivência das células da polpa dentária. Esses genes também desempenham papel fundamental na diferenciação das células pulpares em células odontoblastóides, expressando marcadores como *DSPP* e *DMP1* ao longo do tempo (Min et al., 2008; Lee et al., 2013). No presente estudo, maior expressão dos genes *HMOX1* e *PPARG* ocorreu quando da realização do protocolo de clareamento convencional de consultório (PC), o que caracteriza a resposta das células pulpares ao excesso de free- H_2O_2 que se difundiu através dos discos de smalte/dentina. Mesmo após 7

dias, os menores valores de expressão de *DSPP* e *DMP1* ainda foram encontrados no PC. Por outro lado, o uso da estratégia catalisadora combinada (SN+PPC+LEDv) proposta neste estudo reduziu a expressão dos genes *HMOX1* e *PPARG*, sendo que a expressão de *DSPP* e *DMP1* foi significativamente elevada aos 7 dias. Esses dados permitem sugerir, tal como relatado previamente (Min et al., 2008), que maior diferenciação celular ocorre quanto menor a concentração de H_2O_2 capaz de se difundir pelo esmalte e dentina para alcançar as células pulpares.

Osteopontina (*SPP1*) e osteocalcina (*BGLAP*) são marcadores importantes de mineralização durante a formação de dentina terciária (Benetti et al., 2019). A *SPP1* é uma glicoproteína multifuncional fosforilada essencial na diferenciação de odontoblastos (Matsui et al., 2009), sendo que sua interação com a *BGLAP* facilita a formação de cristais de hidroxiapatita, contribuindo no processo de calcificação na dentinogênese reparadora (Gericke et al., 2005; Benetti et al., 2019). Hirata et al. (2005) também mostraram que *BGLAP* é uma proteína expressa por odontoblastos durante a formação de dentina reacional. Assim, *SPP1* e *BGLAP* parecem ter participação direta no processo de reparo/regeneração do tecido pulpar, tal como previamente demonstrado na polpa de dentes de ratos tratados com géis clareadores (Benetti et al. 2019). Com relação a atividade de fosfatase alcalina (*ALPL*), já foi mostrado que sua expressão é inversamente proporcional a quantidade de free- H_2O_2 em contato com as células pulpares (Soares et al., 2015). Por outro lado, baixas concentrações de free- H_2O_2 podem estimular a atividade de *ALPL* por células pulpares. No presente estudo, foi possível observar maior expressão de *SPP1* e *BGLAP* para as células que receberam o protocolo convencional de clareamento e uma maior expressão de *ALPL* para o protocolo clareador utilizando as estratégias catalisadoras.

Os dados científicos promissores obtidos neste estudo apontam para a viabilidade de desenvolver estratégias de clareamento dental de consultório baseadas na catálise do H_2O_2 . Estas estratégias podem fazer com que a eficácia clareadora seja alcançada num tempo mais curto e com reduzido efeito tóxico para as células pulpares. Também foi demonstrado que o modelo de cultura tridimensional (3D) de células pulpares humanas em matriz de colágeno dentro da câmara pulpar artificial (CPA), permite comparar diferentes terapias clareadoras, determinando os efeitos imediatos do free- H_2O_2 difundido pelo esmalte/dentina, bem como compreender a resposta das células a esta molécula tóxica com o decorrer do tempo. Apesar das limitações metodológicas do presente estudo in vitro e do fato que resultados de pesquisas laboratoriais não podem ser diretamente extrapolados para situações clínicas, foi possível

demonstrar que o revestimento do esmalte com SN+PPC e irradiação do gel clareador com LEDv promove alteração cromática nos tecidos dentários semelhante ao protocolo tradicional de clareamento de consultório e com menor efeito colateral para as células pulpares, o que pode prevenir a sensibilidade dentária pós tratamento. Futuros estudos clínicos/histopatológicos são necessários para determinar a segurança de uso das diferentes estratégias de catálise do H₂O₂, empregadas isoladamente ou em combinação.

REFERÊNCIAS

- Benetti F, Briso ALF, Carminatti M, de Araújo Lopes JM, Barbosa JG, Ervolino E, Gomes-Filho JE, Cintra LTA (2019) The presence of osteocalcin, osteopontin and reactive oxygen species-positive cells in pulp tissue after dental bleaching. *Int Endod J*. 52(5):665-675. <https://doi.org/10.1111/iej.13049>
- Caviedes-Bucheli J, Ariza-García G, Restrepo-Méndez S, Ríos-Osorio N, Lombana N, Muñoz HR (2008) The effect of tooth bleaching on substance P expression in human dental pulp. *J Endod* 34(12): 1462-1465. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2008.09.013>
- Chen C, Huang X, Zhu W, Ding C, Huang P, Li R (2021) H₂O₂ gel bleaching induces cytotoxicity and pain conduction in dental pulp stem cells via intracellular reactive oxygen species on enamel/dentin disc. *PLoS One* 16(9):e0257221. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0257221>
- Costa CA, Riehl H, Kina JF, Sacono NT, Hebling J (2010) Human pulp responses to in-office tooth bleaching. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 109(4): e59-e64. <https://doi.org/10.1016/j.tripleo.2009.12.002>
- de Oliveira Duque CC, Soares DG, Basso FG, Hebling J, de Souza Costa CA (2017) Influence of enamel/dentin thickness on the toxic and esthetic effects of experimental in-office bleaching protocols. *Clin Oral Investig* 21(8): 2509-2520. <https://doi.org/10.1007/s00784-017-2049-7>
- de Oliveira Duque CC, Soares DG, Briso A, Ortecho-Zuta U, de Oliveira Ribeiro RA, Hebling J, de Souza Costa CA (2020) Influence of tooth pigmentation on H₂O₂ diffusion and its cytotoxicity after in-office tooth bleaching. *Oper Dent* 45(6): 632-642. <https://doi.org/10.2341/19-013-L>
- de Oliveira Ribeiro RA, Martins BV, Dias MF, Peruchi V, Soares IPM, Anselmi C, Hebling J, de Souza Costa CA (2024) Catalysis-based approaches with biopolymers and violet LED to improve in-office dental bleaching. *Lasers Med Sci* 39(1): 21. <https://doi.org/10.1007/s10103-023-03962-4>
- de Oliveira Ribeiro RA, Zuta UO, Soares IPM, Anselmi C, Soares DG, Briso ALF, Hebling J, de Souza Costa CA (2022) Manganese oxide increases bleaching efficacy and reduces the cytotoxicity of a 10% hydrogen peroxide bleaching gel. *Clin Oral Investig* 26(12): 7277-7286. <https://doi.org/10.1007/s00784-022-04688-3>

- Gericke A, Qin C, Spevak L, Fujimoto Y, Butler WT, Sørensen ES, Boskey AL (2005) Importance of phosphorylation for osteopontin regulation of biomineralization. *Calcif Tissue Int* 77(1): 45-54. <https://doi.org/10.1007/s00223-004-1288-1>
- Hirata M, Yamaza T, Mei YF, Akamine A (2005) Expression of osteocalcin and Jun D in the early period during reactionary dentin formation after tooth preparation in rat molars. *Cell Tissue Res* 319(3): 455-65. <https://doi.org/10.1007/s00441-004-1035-y>
- Kota BP, Huang TH, Roufogalis BD (2005) An overview on biological mechanisms of PPARs. *Pharmacol Res* 51(2): 85-94.
- Lee YH, Kang YM, Heo MJ, Kim GE, Bhattarai G, Lee NH, Yu MK, Yi HK (2013) The survival role of peroxisome proliferator-activated receptor gamma induces odontoblast differentiation against oxidative stress in human dental pulp cells. *J Endod*. 39(2): 236-241. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2012.11.006>
- Martins BV, Dias MF, de Oliveira Ribeiro RA, Leite MLAES, Hebling J, de Souza Costa CA (2022) Innovative strategy for in-office tooth bleaching using violet LED and biopolymers as H₂O₂ catalysts. *Photodiagn Photodyn Ther* 38:102886. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2022.102886>.
- Matsui S, Takahashi C, Tsujimoto Y, Matsushima K (2009) Stimulatory effects of low-concentration reactive oxygen species on calcification ability of human dental pulp cells. *J Endod*. 35(1): 67-72. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2008.08.034>
- Matsui S, Takeuchi H, Tsujimoto Y, Matsushima K (2008). Effects of Smads and BMPs induced by Ga-Al-As laser irradiation on calcification ability of human dental pulp cells. *J Oral Sci* 50(1): 75-81. <https://doi.org/10.2334/josnusd.50.75>
- Meireles SS, Santos ME, Lustosa IMC, Leite ELL (2021) Effects of a reduced in-office bleaching protocol with 37.5% hydrogen peroxide on effectiveness and tooth sensitivity: a double-blind randomized clinical trial. *J Esthet Restor Dent* 33(5): 824–831, <https://doi.org/10.1111/jerd.12744>
- Mendes Soares IP, Anselmi C, Pires MLBA, Ribeiro RAO, Leite ML, Soares DG, DE Souza Costa CA, Hebling J (2023) Chronic exposure to lipopolysaccharides as an in vitro model to simulate the impaired odontogenic potential of dental pulp cells under pulpitis conditions. *J Appl Oral Sci* 31: e20230032. <https://doi.org/10.1590/1678-7757-2023-0032>
- Min KS, Lee HJ, Kim SH, Lee SK, Kim HR, Pae HO, Chung HT, Shin HI, Lee SK, Kim EC (2008) Hydrogen peroxide induces heme oxygenase-1 and dentin sialophosphoprotein mRNA in human pulp cells. *J Endod*. 34(8): 983-989. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2008.05.012>
- Ortecho-Zuta U, de Oliveira Duque CC, de Oliveira Ribeiro RA, Leite ML, Soares DG, Hebling J, Briso ALF, de Souza Costa CA (2021) Polymeric biomaterials maintained the esthetic efficacy and reduced the cytotoxicity of in-office dental bleaching. *J Esthet Restor Dent* 33(8):1139-1149. <https://doi.org/10.1111/jerd.12805>.
- Ortecho-Zuta U, de Oliveira Duque CC, de Oliveira Ribeiro RA, Leite ML, Soares DG, Hebling J, Briso ALF, de Souza Costa CA (2022) Strategy for reducing cytotoxicity and obtaining esthetic efficacy with 15 min of in-office dental bleaching. *Clin Oral Investig* 26(5): 4099-4108. <https://doi.org/10.1007/s00784-022-04379-z>

- Rezende M, da Silva KL, Miguel TC, Farago PV, Loguercio AD, Martins LD, Reis A (2020) Prior application of 10% potassium nitrate to reduce postbleaching sensitivity: a randomized triple-blind clinical trial. *J Evid Based Dent Pract* 20(2): 101406. <https://doi.org/10.1016/j.jebdp.2020.101406>
- Roderjan DA, Stanislawczuk R, Hebling J, Costa CADS, Reis A, Loguercio AD (2015) Response of human pulps to different in-office bleaching techniques: preliminary findings. *Braz Dent J* 26:242-248.
- Roderjan DA, Stanislawczuk R, Soares DG, de Souza Costa CA, Favoreto MW, Reis A, Loguercio AD (2023) Effect of medium or high concentrations of in-office dental bleaching gel on the human pulp response in the mandibular incisors. *Restor Dent Endod* 48(2).
- Sato S, Nakamura K, Nakamura H (2017) Horseradish-peroxidase-catalyzed tyrosine click reaction. *Chembiochem* 18(5): 475-8. <https://doi.org/10.1002/cbic.201600649>
- Soares DG, Basso FG, Hebling J, de Souza Costa CA (2014) Concentrations of and application protocols for hydrogen peroxide bleaching gels: effects on pulp cell viability and whitening efficacy. *J Dent* 42(2): 185-198.
- Soares DG, Basso FG, Hebling J, de Souza Costa CA (2014) Concentrations of and application protocols for hydrogen peroxide bleaching gels: effects on pulp cell viability and whitening efficacy. *J Dent* 42(2): 185–198. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2013.10.021>
- Soares DG, Basso FG, Scheffel DS, Hebling J, de Souza Costa CA (2015) Responses of human dental pulp cells after application of a low-concentration bleaching gel to enamel. *Arch Oral Biol* 60(9): 1428-1436. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2015.06.014>
- Soares DG, Bordini EAF, Bronze-Uhle ES et al (2021) Chitosan-calcium-simvastatin scaffold as an inductive cell-free platform. *J Dent Res* 100(10):1118-1126.
- Soares DG, Gonçalves Basso F, Hebling J, de Souza Costa CA (2015) Effect of hydrogen peroxide-mediated oxidative stress on human dental pulp cells. *J Dent* 43(6): 750–756. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2014.12.006>
- Soares DG, Marcomini N, Duque CCO, Bordini EAF, Zuta UO, Basso FG, Hebling J, Costa CAS (2019) Increased whitening efficacy and reduced cytotoxicity are achieved by the chemical activation of a highly concentrated hydrogen peroxide bleaching gel. *J Appl Oral Sci.* 27: e20180453. <https://doi.org/10.1590/1678-7757-2018-0453>
- Sun W, Wang Z, Cao J, Cui H, Ma Z (2016) Cold stress increases reactive oxygen species formation via TRPA1 activation in A549 cells. *Cell Stress Chaperones* 21(2): 367-372. <https://doi.org/10.1007/s12192-015-0663-3>
- Trevisan G, Hoffmeister C, Rossato MF, Oliveira SM, Silva MA, Silva CR, Fusi C, Tonello R, Minocci D, Guerra GP, Materazzi S, Nassini R, Geppetti P, Ferreira J (2014) TRPA1 receptor stimulation by hydrogen peroxide is critical to trigger hyperalgesia and inflammation in a model of acute gout. *Free Radic Biol Med* 72: 200–9. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.04.021>
- Viana F (2016) TRPA1 channels: molecular sentinels of cellular stress and tissue damage. *J Physiol* 594(15): 4151-4169. <https://doi.org/10.1113/JP270935>

4 INTER-RELAÇÃO ENTRE AS PUBLICAÇÕES

A Publicação 1 deste estudo foi fundamental para estabelecer, em nível laboratorial, um protocolo de manchamento dentário eficiente e padronizado para ser empregado nas etapas seguintes, bem como nas futuras pesquisas *in vitro* de clareamento dental. Os resultados dessa fase mostraram que o componente ativo liberado do gel clareador atua de maneira eficaz sobre diversos tipos de pigmentos, tais como àqueles derivados do chá preto, vinho, café e suas combinações. Além disso, observou-se que a presença dos pigmentos nos tecidos dentários impacta os resultados de citotoxicidade. Isso porque os maiores índices de difusão trans-amelodentinária de H_2O_2 e consequentemente os menores valores de viabilidade celular foram encontrados nos grupos onde discos de esmalte/dentina não submetidos aos protocolos experimentais de manchamento foram clareados. Desta forma, ficou evidente a relevância de se padronizar a cor dos discos de esmalte/dentina em pesquisas que buscam avaliar e comparar a eficácia estética e citotoxicidade de novos protocolos de clareamento. Considerando as limitações desta etapa inicial do estudo, os resultados apresentados permitiram sugerir que procedimentos clareadores podem causar danos pulpareis mais graves quanto mais claros os dentes submetidos a esta modalidade de terapia estética.

O objetivo da Publicação 2 do estudo foi estabelecer um protocolo de irradiação com LED violeta para clareamento dental de consultório, visto que não havia uma técnica bem definida para esta modalidade de terapia estética. De acordo com os dados obtidos na Publicação 1, os discos de esmalte/dentina foram manchados com chá preto. Em seguida, a irradiação com LED violeta foi realizada pelos períodos de 15, 30 e 45 minutos, juntamente com cada troca do gel clareador. Observou-se que, independentemente do tempo de irradiação do gel clareador, o uso do LED violeta aumentou a eficácia clareadora do procedimento estético comumente empregado no consultório. No entanto, a irradiação do gel clareador não reduziu a difusão trans-amelodentinária de free- H_2O_2 , o que fez com que os protocolos testados resultassem em efeitos citotóxicos comparáveis àqueles causados pelo clareamento convencional de consultório.

Com o objetivo de reduzir a citotoxicidade e acelerar a alteração cromática dos tecidos dentários escurecidos, o que poderia reduzir o tempo necessário para realizar o clareamento dental de consultório, a Publicação 3 deste estudo avaliou um protocolo inovador de clareamento combinado. Neste, o esmalte dentário era revestido com biopolímeros catalisadores e o gel aplicado sobre eles era irradiado com LED violeta. Para executar esta

etapa, isso, um scaffold nanofibrilar com 12,5% de poli-caprolactona (PCL) e um primer polimérico de hidroxipropil metilcelulose (HPMC) contendo 10 mg/mL da enzima peroxidase hêmica (HRP) foram desenvolvidos. Esses biopolímeros foram usados para revestir o esmalte dentário antes da aplicação do gel clareador, o qual foi irradiado com LED violeta por 15 minutos, tal como estabelecido na Publicação 2 deste estudo. Observou-se que a estratégia de degradar o H_2O_2 liberado do gel clareador, por meio do uso combinado de biopolímeros catalisadores e da fotocatalise com LED violeta, reduziu a citotoxicidade da terapia clareadora convencional de consultório. O protocolo catalisador experimental avaliado na Publicação 3 do estudo também aumentou a eficácia clareadora, o que fez com que a excelente alteração cromática obtida após 1 sessão de 45 minutos do clareamento convencional de consultório fosse alcançada em apenas 15 minutos.

Após concluir as Publicações 1, 2 e 3 deste projeto, foi possível selecionar a estratégia mais segura e eficaz para proceder o clareamento dental de consultório. Então, na última etapa deste amplo projeto de pesquisa (Publicação 4), foi proposto avaliar o impacto dessa estratégia inovadora de catálise química/fotocatalise do H_2O_2 liberado de géis clareadores de consultório, utilizando para isso um modelo de cultura tridimensional (3D) preparado com células da polpa dentária humana (HDPCs) obtidas da polpa de terceiros molares hígidos (CAAE: 77373824.6.0000.5416). O arcabouço para a cultura celular foi preparado misturando 200 μ L de colágeno tipo 1, 40 μ L de meio de cultura α MEM 10x e 1 μ L de hidróxido de sódio [5M]. A cultura 3D foi posicionada em contato direto com a superfície dentinária dos discos de esmalte/dentina previamente manchados com chá-preto, sendo que este modelo experimental permitiu analisar, de forma comparativa, os efeitos dos tratamentos sobre um pool de células da polpa dentária, bem como a profundidade de ação dos componentes tóxicos liberados do gel clareador. Foi possível demonstrar nesta Publicação 4, a viabilidade de utilizar o modelo de cultura 3D para testes *in vitro* mais realísticos de diferentes protocolos de clareamento dental. DE maneira geral, a estratégia catalítica combinada, a qual apresentou os melhores resultados na Publicação 3 do projeto, também determinou os menores níveis de estresse oxidativo celular, o que caracterizou o discreto efeito citotóxico trans-amelodentinário sobre as HDPCs. Este interessante modelo experimental, utilizado nesta etapa do projeto para tentar mimetizar as condições *in vivo*, permitiu avaliar ainda, a expressão de marcadores inflamatórios pelas HDPCs que entraram em contato direto com os componentes do gel clareador que se difundiu pelo esmalte e dentina. Assim, foi determinado que a estratégia de degradar o H_2O_2 , por meio do uso combinado de biopolímeros catalisadores e da irradiação do gel clareador com LED

violeta, consegue reduzir a expressão de marcadores inflamatórios, bem como regular positivamente a expressão de marcadores de mineralização em comparação com a terapia convencional de clareamento dental de consultório.

5 CONCLUSÕES

- O tipo de solução de manchamento utilizada não interfere na citotoxicidade de estudo de clareamento dental in vitro.
- A irradiação com o LED Violeta favorece a alteração de cor do esmalte/dentina, entretanto, o aumento do tempo de irradiação não melhora a eficácia estética e nem reduz a citotoxicidade trans-amelodentinária do clareamento dental de consultório.
- A estratégia de irradiar com o LED Violeta um gel clareador com 35% H_2O_2 , aplicado por apenas 15 minutos sobre o esmalte dentário previamente revestido com um scaffold de nanofibras e um primer polimérico catalisador, alcança a eficácia estética e reduz a citotoxicidade comumente causada pelo clareamento convencional de consultório.
- Além de tornar o procedimento clareador mais rápido e reduzir a citotoxicidade, a nova estratégia clareadora proposta exibe menor expressão de marcadores inflamatórios e regula positivamente a expressão de marcadores para mineralização avaliado em modelo de cultura 3D de células pulpares humanas.

REFERÊNCIAS*

1. Rodrigues JL, Rocha PS, Pardim SLS, Machado ACV, Faria-E-Silva AL, Seraidarian PI. Association between in-office and at-home tooth bleaching: a single blind randomized Clinical Trial. *Braz Dent J*. 2018; 29(2): 133-9.
2. Bersezio C, Martín J, Prieto MV, Meneses P, Angel P, Eduardo Fernández G, et al. One-year bleaching efficacy using two HP products with different pH: A double-blind randomized clinical trial. *J Esthet Restor Dent*. 2019; 31(5): 493-99.
3. De Lima AF, Lessa FC, Gasparoto Mancini MN, Hebling J, de Souza Costa CA, Marchi GM. Cytotoxic effects of different concentrations of a carbamide peroxide bleaching gel on odontoblast-like cells MDPG-23. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2009; 90(2): 907-12
4. Soares DG, Basso FG, Hebling J, de Souza Costa CA. Immediate and late analysis of dental pulp stem cells viability after indirect exposition to alternative in-office bleaching strategies. *Clin Oral Investig*. 2015; 19: 1013-20.
5. Benetti F, Lemos CAA, de Oliveira Gallinari M, Terayama AM, Briso ALF, de Castilho Jacinto R, Sivieri-Araujo G, Cintra LTA. Influence of different types of light on the response of the pulp tissue in dental bleaching: a systematic review. *Clin Oral Investig*. 2018; 22(4): 1825-37
6. Briso ALF, Rahal V, Gallinari MO, Soares DG, de Souza Costa, CA. Complications from the use of peroxides. *Perdigao J* (editor). *Tooth Whitening*. 1 ed. Springer International Publishing Switzerland; 2016. p. 45-79.
7. Martins LM, Lima E Souza LA, Sutil E, da Silva LM, Silva J, Reis A, Loguercio AD. Clinical effects of desensitizing prefilled disposable trays in in-office bleaching: A randomized single-blind clinical trial. *Oper Dent*. 2020; 45(1): e1-10.
8. Soares DG, Basso FG, Hebling J, de Souza Costa CA. Concentrations of and application protocols for hydrogen peroxide bleaching gels: effects on pulp cell and application protocols for hydrogen peroxide bleaching gels: effects on pulp cell viability efficacy: *J Dent*. 2014; 42(2): 185-9.
9. Soares DG, Basso FG, Pontes EC, Garcia LD, Hebling J, de Souza Costa CA. Effective tooth-bleaching protocols capable of reducing H₂O₂ diffusion through enamel and dentine. *J Dent*. 2013; 42(3): 351-8.
10. de Oliveira Duque CC, Soares DG, Basso FG, Hebling J, de Souza Costa CA. Influence of enamel/dentin thickness on the toxic and esthetic effects of experimental in-office bleaching protocols. *Clin Oral Investig*. 2017; 21(8): 2509-20.
11. 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(4): 59-64.

* De acordo com o Guia de Trabalhos Acadêmicos da FOAr, adaptado das Normas Vancouver. Disponível no site da Biblioteca: <http://www.foar.unesp.br/Home/Biblioteca/guia-de-normalizacao-atualizado.pdf>

12. Roderjan DA, Stanislawczuk R, Hebling J, de Souza Costa CA, Soares DG, Reis A, Loguercio AD. Histopathological Features of dental pulp tissue from bleached mandibular incisors. *J Mater Sci and Eng B* 2014; 6: 178-85.
13. Acuña ED, Parreiras SO, Favoreto MW, Cruz GP, Gomes A, Borges CPF et al. In-office bleaching with a commercial 40% hydrogen peroxide gel modified to have different pHs: color change, surface morphology, and penetration of hydrogen peroxide into the pulp chamber. *J Esthet Restor Dent*. 2022; 34(2): 322-7.
14. Haywood VB, Heymann HO. Nightguard vital bleaching. *Quintessence Int*. 1989; 20(3): 173-6.
15. de Geus JL, Wambier LM, Kossatz S, Loguercio AD, Reis A. At-home vs In-office Bleaching: A Systematic Review and Meta-analysis. *Oper Dent*. 2016; 41(4): 341-56
16. Carey CM. Tooth whitening: what we now know. *J Evid Based Dent Pract*. 2014; 14: 70-6.
17. Kossatz S, Martins G, Loguercio AD, Reis A. Tooth sensitivity and bleaching effectiveness associated with use of a calcium containing in-office bleaching gel. *J Am Dent Assoc*. 2012; 143: e81-7
18. Faus-Matoses V, Palau-Martínez I, Amengual-Lorenzo J, Faus-Matoses I, Faus-Llácer VJ. Bleaching in vital teeth: Combined treatment vs in-office treatment. *J Clin Exp Dent*. 2019; 11(8): e754-8.
19. Ortecho-Zuta U, de Oliveira Duque CC, Leite ML, Bordini E, Basso FG, Hebling J, de Souza Costa CA, Soares DG. Effects of enzymatic activation of bleaching gels on hydrogen peroxide degradation rates, bleaching effectiveness, and cytotoxicity. *Oper Dent*. 2019; 44(4): 414-23.
20. Soares DG, Marcomini N, Duque CCO, Bordini EAF, Ortecho-Zuta U, Basso F, Hebling J, de Souza Costa CA. Increased whitening efficacy and reduced cytotoxicity are achieved by the chemical activation of a highly concentrated hydrogen peroxide bleaching gel. *J Appl Oral Sci*. 2019; 27: e20180453:1-10.
21. Khanmohammadi M, Dastjerdi MB, Ai A, Ahmadi A, Godarzi A, Rahimia A, Ai J. Horseadish peroxidase-catalyzed hydrolation for biomedical applications. *Biomater Sci*. 2018; 6(6): 1-43
22. Gantumur E, Sakai S, Nkahata M, Taya M. Horseadish peroxidase-catalydes hydrogelation consuming enzyme-produced hydrogen peroxide in the presence of reducing sugars. *Soft Matter*. 2019; 15: 2163-9.
23. Chen JH, Xu JW, Shing CX. Decomposition rate of hydrogen peroxide bleaching agents under various chemical and physical conditions. *J Prosthet Dent*. 1993; 69(1): 46-8.
24. Bergendi L, Beneš L, Ďuračková Z, Ferenčík M. Chemistry, physiology and pathology of free radicals. *Life Sciences*. 1999; 65: 1865-74.
25. Ubaldini AL, Baesso ML, Medina Neto A, Sato F, Bento AC, Pascotto RC. Hydrogen peroxide diffusion dynamics in dental tissues. *J Dent Res*. 2013; 92(7): 661-5.
26. Kawamoto K, Tsujimoto Y. Effects of the hydroxyl radical and hydrogen peroxide on tooth bleaching. *J Endod*. 2004; 30(1): 45-50
27. Goldberg M, Grootveld M, Lynch E. Undersirable and adverse effects of tooth whitening products: a review. *Clin Oral Investig*. 2010; 14(1): 1-10.

28. Travassos AC, Rocha Gomes Torres C, Borges AB, Barcellos DC. In vitro assessment of chemical activation efficiency during in-office dental bleaching. *Oper Dent*. 2010; 35(3): 287-94.
29. Gopinath S, James V, Vidhya S, Karthikeyan K, Kavitha S, Mahalaxmi S. Effect of bleaching with two different concentrations of hydrogen peroxide containing sweet potato extract as an additive on human enamel: an in vitro spectrophotometric and scanning electron microscopy analysis. *J Conserv Dent*. 2013; 16(1): 45-9.
30. Dash TK, Konkimalla VB. Poly(E-caprolactone) based formulation for drug delivery and tissue engineering: A review. *J Control Release*. 2012; 158: 15-33.
31. Atyabi SM, Sharifi F, Irani S, Zandi M, Mivehchi H, Nagheh Z. Cell attachment and viability study of PCL nano-fiber modified by cold atmospheric plasma. *Cell Biochem Biophys*. 2016; 74(2): 181-90.
32. Dabouian A, Bakhshi H, Irani S, Pezeshki-Modaress M. β -Carotene: a natural osteogen to fabricate osteoinductive electrospun scaffolds. *RSC Adv*. 2018; 18: 9941-5.
33. Jin HJ, Fridrikh SV, Rutledge GC, Kaplan DL. Electrospinning Bombyx mori silk with poly(ethylene oxide). *Biomacromolecules*. 2002;3(6): 1233-9.
34. Klaric E, Rakic M, Marcius M, Ristic M, Sever I, Tarle Z. Optical effects of experimental light-activated bleaching procedures. *Photomed Laser Surg*. 2014; 32(3): 160-7.
35. Zanin F. Recent advances in dental bleaching with laser and LEDs. *Photomed Laser Surg*. 2016;34(4):135-6.
36. Santos AECGD, Bussadori SK, Pinto MM, Pantano Junior DA, Brugnera AJr, Zanin FAA, Rodrigues MFSD, Motta LJ, Horliana ACRT. Evaluation of in-office tooth whitening treatment with violet LED: protocol for a randomised controlled clinical trial. *BMJ Open*. 2018; 8(9): e021414.
37. Kwon SR, Oyoyo U, Li Y. Effect of light activation on tooth whitening efficacy and hydrogen peroxide penetration: an in vitro study *J Dent*. 2013; 41 Suppl3: e39-45.
38. Almeida ENM, Bessegato JF, Dos Santos DDL, de Souza Rastelli AN, Bagnato VS. Violet LED for non-vital tooth bleaching as a new approach. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2019; 28: 234-7.
39. Gallinari MO, Cintra LTA, Souza MBA, et al. Clinical analysis of color change and tooth sensitivity to violet LED during bleaching treatment: A case series with split-mouth design. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2019b; 27: 59-65.
40. Gallinari MO, Fagundes TC, da Silva LM, de Almeida Souza MB, Barboza A, Briso A. A New Approach for Dental Bleaching Using Violet Light With or Without the Use of Whitening Gel: Study of Bleaching Effectiveness. *Oper Dent*. 2019a; 44(5): 521-9.
41. Kury M, Perches C, da Silva DP, André CB, Tabchoury CPM, Giannini M, Cavalli V. Color change, diffusion of hydrogen peroxide, and enamel morphology after in-office bleaching with violet light or nonthermal atmospheric plasma: An in vitro study. *J Esthet Restor Dent*. 2020; 32(1): 102-12.

42. Brugnera AP, Nammour S, Rodrigues JA, et al. Clinical Evaluation of In-Office Dental Bleaching Using a Violet Light-Emitted Diode. *Photobiomodul Photomed Laser Surg.* 2020; 38(2): 98-104

APÊNDICE A – METODOLOGIA DETALHADA

1. Obtenção dos discos de esmalte e dentina

Discos de esmalte e dentina com 5,6 mm de diâmetro foram obtidos a partir da face vestibular de incisivos bovinos, por meio de uma broca diamantada do tipo trefina (Dinser brocas diamantadas LTDA, São Paulo, SP, Brasil) acoplada a uma furadeira de bancada (FSB 16 Pratika, Schultz, Joinville, SC, Brasil) em um ambiente submerso em água a 4°C. A espessura dos discos foi padronizada em 2,3 mm de maneira a simular a espessura de incisivos inferiores humanos, por meio de desgastes da superfície dentinária 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. Em seguida, para os discos que foram utilizados na avaliação da eficácia clareadora, uma broca diamantada acoplada a um motor de alta rotação (Dabi Atlante, Ribeirão Preto, SP, Brasil) foi utilizada para realizar um leve desgaste na borda dos discos (marcação), a fim de padronizar o posicionamento destes no momento da realização das leituras de cor antes e após os procedimentos clareadores. Com uma escova de Robinson adaptada em um motor de baixa rotação (Dabi Atlante, Ribeirão Preto, SP, Brasil), foi realizada a profilaxia da superfície de dentina com pedra-pomes e água. Então, a superfície da dentina foi tratada com EDTA disódico (ácido etilenodiamino tetra-acético; Sigma-Aldrich Corp.) 0,5 M por 30 segundos para remoção da smear layer. A superfície de esmalte não foi desgastada, apenas foi submetida a profilaxia com pedra-pomes e água.

2. Padronização da cor dos discos

Os discos foram submetidos a uma leitura inicial da coloração (baseline), seguida de um protocolo de manchamento extrínseco com chá preto, com o objetivo de padronizar a cor inicial dos dentes em todos os grupos. Os discos foram submersos em uma solução de chá-preto (Leão Jr S. A., Fazenda Rio Grande, PR, Brasil), produzida pela filtração de 3,2 g de chá em 100 mL de água fervente durante 5 minutos, e foram incubados por 24 horas a 37°C, seguido de profilaxia na superfície de esmalte com solução de pedra-pomes e água para remover os pigmentos superficiais. Os discos foram armazenados com a dentina em contato com algodão embebido em água deionizada, e com o esmalte em contato com algodão embebido em uma solução tipo saliva por 72 horas para padronizar o grau de hidratação dos espécimes. A análise da alteração de cor dos espécimes foi realizada segundo o sistema CIE L*a*b* estabelecido

pela Comissão Internationale de l'Eclairage – CIE (Comissão Internacional sobre Iluminação). De acordo com esta escala de cor, a variável L^* é a medida do brilho do objeto e é quantificada em uma escala onde o preto apresenta um valor de L^* igual a zero e a luz totalmente refletida um valor de L^* igual a 100. A coordenada a^* é a medida da quantidade de vermelho ($+a^*$) e verde ($-a^*$); já a coordenada b^* representa a quantidade de amarelo ($+b^*$) e azul ($-b^*$). Para tanto, foi utilizado um Espectrofotômetro de Reflexão Ultravioleta Visível portátil (Color Guide, BYK Gardner GmbH Geretsried, Alemanha) com comprimento de onda variando de 400 nm a 700 nm, iluminação padrão D65 e ângulo de iluminação/observação 45/0°. Os espécimes foram posicionados em uma matriz de silicone branco, de forma que apenas a superfície de esmalte permanecesse exposta. O espectrofotômetro foi posicionado sobre o espécime de forma padronizada com o auxílio de um suporte, sendo realizadas três leituras em cada análise, obtendo-se uma média. Para análise da alteração de cor, os valores de $L^*a^*b^*$ obtidos antes e 72 horas após o manchamento foram aplicados nas seguintes equações:

Equação do CIEDE2000 $\sqrt{\left(\frac{\Delta L'}{k_L S_L}\right)^2 + \left(\frac{\Delta C'}{k_C S_C}\right)^2 + \left(\frac{\Delta H'}{k_H S_H}\right)^2 + R_T \frac{\Delta C'}{k_C S_C} \frac{\Delta H'}{k_H S_H}}$ Equação do Índice de Clareamento 4) $WI = 0,511L^* - 2,3424a^* - 1,100b^*$ 5) $\Delta WI = WI_{\text{afterbleaching}} - WI_{\text{baseline}}$
--

3. Desenvolvimento do scaffold de nanofibras

Foi formulado um scaffold de nanofibras à base de uma solução de poli-caprolactona (PCL, Sigma-Aldrich). Portanto, para desenvolvimento da formulação do scaffold de nanofibras, uma solução à base de 12,5% de poli-caprolactona (PCL; w/v) foi preparada em clorofórmio/dimetilformamida (8:2) (Synth, São Paulo, SP, Brasil) por 24 h sob agitação magnética constante. A seguir, esta solução polimérica foi submetida à técnica de electrospinning (Figura 1) pelo tempo de 45 minutos. A solução testada foi transferida para uma seringa com agulha de aço inoxidável de calibre de 18 gauge, a qual foi conectada em uma bomba de injeção automática (KDScientific, Holliston, MA, EUA) sob a velocidade de 1 mL/h. A voltagem da fonte de alta tensão foi de 18 kV e a distância entre a ponta da agulha e o coletor

foi de 15 cm. Para obtenção de uma malha randômica de nanofibras, foi utilizado um coletor plano de alumínio, disposto perpendicularmente à seringa. Após a síntese dos scaffolds de nanofibras, estes foram submetidos à secagem em dessecador à temperatura ambiente pelo período de 72 horas para eliminação do solvente residual. Em seguida, foram obtidos espécimes com 6 mm de diâmetro.

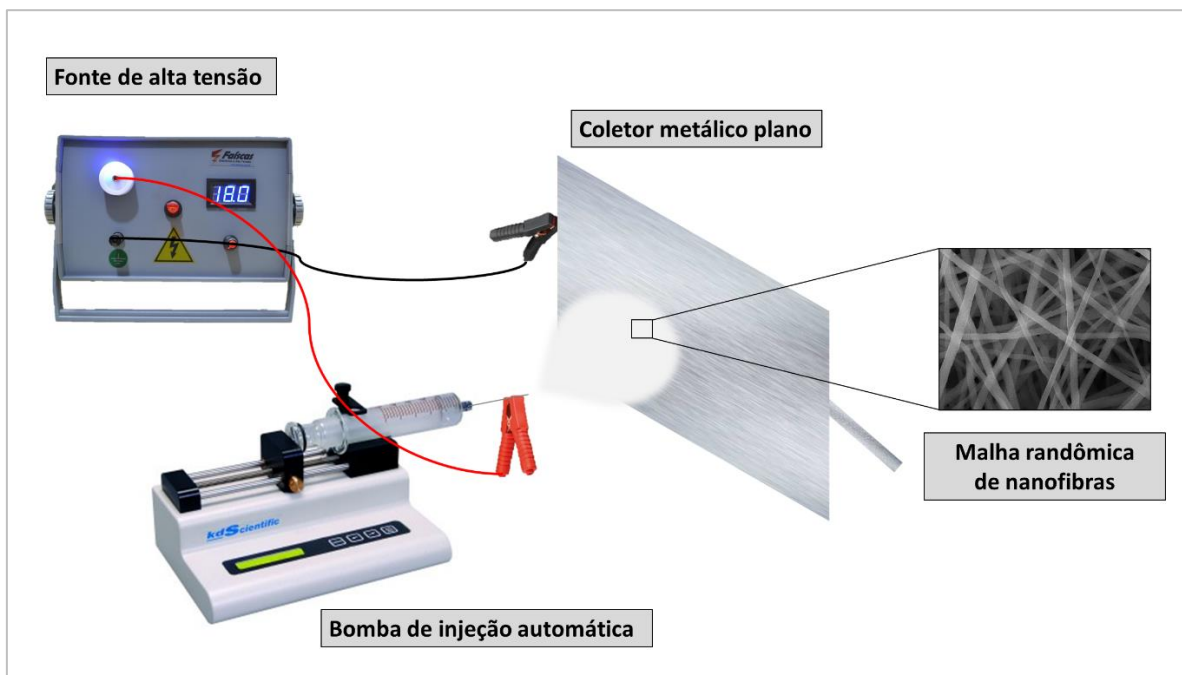


Figura 1. Imagem ilustrativa do sistema de electrospinning.

4. Elaboração do Primer Catalisador

Este material foi desenvolvido com a finalidade de atuar como veículo da peroxidase hemica, a qual atuou como catalizador químico na reação. Desta maneira, foi preparado um Primer Catalisador resistente ao escoamento, capaz de formar uma película sobre o esmalte. Foi empregado o hidroxipropil metilcelulose (HPMC; Sheffcel, Kerry; Beloit, WI, EUA) como polímero base. O pó de HPMC (1g) na viscosidade de 100 mPa.s. foi diluído em H₂O_{UP} (10mL) para obter uma solução a 10% (w/v). O preparo do gel foi realizado sob agitação magnética em temperatura ambiente por 6h, o qual foi posteriormente armazenado na geladeira por 24h. A seguir, 10 mg/mL de HRP (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) foi incorporada ao Primer Catalisador para ser utilizado nas análises experimentais.

5. Análise de alteração de cor

Após distribuição dos discos nos grupos controles e experimentais, os mesmos foram incubados em estufa a 37°C em ambiente úmido. Este procedimento consiste em armazenar os discos em placas de 24 compartimentos com a superfície de dentina em contato com algodão embebido em água destilada e a superfície de esmalte em contato com algodão embebido em saliva artificial. Os discos foram mantidos nesta condição por um período de 48 horas, sendo os valores iniciais de L* a* e b* mensurados (baseline). O tratamento a ser realizado na superfície de esmalte foi de acordo com os protocolos descritos nas Publicações. Os discos foram mantidos em ambiente úmido, conforme previamente descrito, nos intervalos das aplicações. Para análise da alteração de cor, os valores de L*a*b* antes e 72 horas após cada sessão de clareamento, conforme o item 2.

6. Citotoxicidade trans-amelodentinária

6.1 Cultivo celular: Células imortalizadas de linhagem odontoblástica MDPC-23 foram semeadas na superfície de lamínulas de vidro (6×10^4 células/lamínula), posicionadas em placas de 24 compartimentos (KASVI Imp., Curitiba, PR, Brasil), bem como diretamente em placas de 96 compartimentos (1×10^4 células/well; KASVI Imp.) com meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; GIBCO, Grand Island, NY, EUA) contendo 10% de soro fetal bovino (SFB; GIBCO), 100 IU/mL e 100 µg/mL, respectivamente de penicilina e estreptomicina (GIBCO) e incubados em uma atmosfera umedecida a 37°C e 5% de CO₂ (Thermo Fisher Scientific, Asheville, NC, EUA), para obtenção de um padrão de 80% de confluência.

6.2 Citotoxicidade trans-amelodentinária: Os discos de esmalte/dentina previamente submetidos ao protocolo de manchamento, foram adaptados através do uso de anéis de silicone, em câmaras pulpares artificiais (CPAs), vedada na periferia com cera utilidade, sendo o conjunto disco/CPA esterilizado por óxido de etileno (STERIOX, Limeira, SP, Brasil). Previamente ao protocolo experimental, os scaffolds de nanofibras foram submetidos a um protocolo de lavagem/desinfecção com álcool 50% (10 min – 1x), álcool 70% (20 min – 3x) e PBS (10 min – 2x) e mantidas em PBS completo overnight. Após esse período, o PBS foi aspirado e os scaffolds armazenados por 48h em incubadora a 37°C para secagem. Então, em ambiente asséptico, os conjuntos disco/CPA esterilizados foram posicionados em placas de 24

compartimentos com 1 mL de meio de cultura sem SFB (Figura 2), de forma que o meio permanecesse em contato com a superfície de dentina e o esmalte exposto para receber os tratamentos de acordo com as Publicações. Após o término do procedimento clareador, o extrato em contato com a dentina, foi coletado, homogeneizado e distribuído em alíquotas de 300 μ L ou de 100 μ L, as quais foram aplicadas nas células previamente semeadas em placas de 24 ou 96 compartimentos, respectivamente. As células foram incubadas a 37°C e 5% de CO₂ com os extratos por 1 hora e foram submetidas às análises descritas a seguir. Alíquotas de 100 μ L também foram reservadas para quantificação da difusão de H₂O₂.

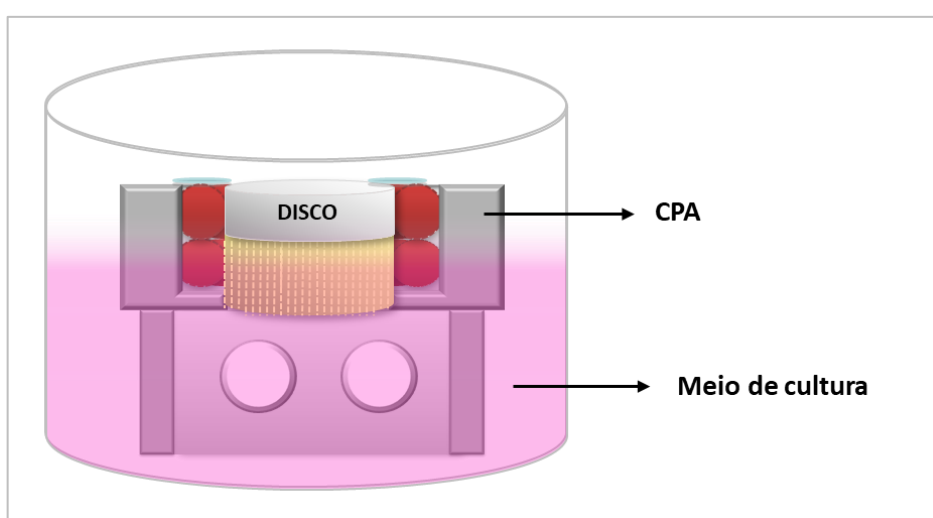


Figura 2. Modelo in vitro de avaliação da citotoxicidade trans-amelodentinária.

6.3 Viabilidade celular (Alamar Blue): Alíquotas de 100 μ L de cada extrato foram aplicadas sobre as células previamente cultivadas em compartimentos de placas de acrílico esterilizadas de 96 compartimentos (KASVI Imp.). Após 1 h de incubação, os extratos foram aspirados e as células que permanecerem aderidas ao fundo dos compartimentos foram incubadas por 4 hs em contato uma solução composta por 90 μ L de DMEM e 10 μ L da solução Alamar Blue (Life Technologies; Grand Island, NY, EUA). Então, a solução foi coletada e transferida para uma placa de 96 compartimentos (KASVI Imp.), sendo a absorbância mensurada a 570 nm em espectrofotômetro (Synergy H1, Biotek, Winooski, EUA).

6.4 Ensaio de Live/Dead: O ensaio foi realizado com o kit Live/Dead Cell Viability/Cytotoxicity (Invitrogen, San Francisco, CA, EUA), que utiliza a sonda de fluorescência Ethyl homodimer-1 (Eth-1) que se liga a bandas de DNA apenas em células com

ruptura da membrana celular (vermelho). A segunda sonda foi a Calcein AM (CA), que é hidrolisada por esterases citoplasmáticas em células viáveis (verde)

6.5 Morfologia celular: Após o período de incubação das células em contato com os extratos, as células semeadas sobre as lamínulas de vidro foram fixadas por glutaraldeído 2,5% em PBS (60 min). Seguida da fixação inicial, as células foram lavadas com PBS (5 min – 2x), pós-fixadas em tetróxido de ósmio a 1% (Sigma-Aldrich) (60 min), desidratadas em soluções com concentração crescente de etanol 30% (30 min), 50% (30 min), 70% (30 min), 95% (30 min – 2x) e 100% (30 min – 2x) e lavadas em HMDS (1,1,1,3,3,3,- Hexamethyldisilazane; Sigma-Aldrich) (20 min – 3x). Posteriormente as lamínulas foram posicionadas sobre stubs metálicos com uma fita de carbono e mantidas em dessecador com sílica gel durante 72 horas, para serem em seguida metalizadas com ouro (40 segundos) e analisadas em microscópio eletrônico de varredura (MEV; JEOL JSM-6610LV).

6.6 Avaliação do estresse oxidativo: Para esta análise, as células semeadas em placas de 96 compartimentos, foram pré-tratadas com a sonda fluorescente carboxy-H2DCFDA (Invitrogen, San Francisco, CA, EUA) na concentração de 5 mM durante 30 minutos. Imediatamente após exposição aos extratos, a fluorescência foi monitorada em leitor de fluorescência a 492 nm de excitação e 517 nm de emissão (Synergy H1, Biotek).

6.7 Quantificação da difusão de H₂O₂: Para esta análise, uma alíquota de 100 µL foi coletada e transferida para tubos de ensaio contendo 900 µL de solução tampão acetato (2 M, pH 4,5). Em seguida, foram transferidos 500 µL desta solução para tubos de ensaio contendo solução de violeta leucocristal (0,5 mg/mL; Sigma-Aldrich Corp.). Os tubos foram ressuspensos, sendo adicionado 50 µL de solução a 1 mg/mL da enzima peroxidase hemica (Sigma-Aldrich). A absorbância da solução resultante foi mesurada através de espectrofotômetro com comprimento de onda de 596 nm (Synergy H1, Biotek). Uma curva padrão de H₂O₂ foi utilizada para a conversão dos valores de densidade óptica obtidos das amostras em µL/mL.

7. Obtenção de células da polpa dental humana (HDPCs)

Quatro terceiros molares inclusos ou semi-inclusos hígidos recém-extraídos foram obtidos de voluntários de ambos os sexos, com faixa etária de 18 a 24 anos, após assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido mediante aprovação do Comitê de Ética em Seres Humanos (CEP) da Faculdade de Odontologia de Araraquara (FOAr - UNESP). Estes pacientes foram atendidos na Clínica de Cirurgia da mesma Instituição e, após a extração, os dentes foram acondicionados imediatamente em tubos tipo Falcon contendo α MEM (Minimum Essential Medium Eagle Apha) suplementado com antibiótico e antifúngico (Gibco, Grand Island, NY, EUA; 100 U/mL penicillina, 100 g/mL estreptomicina, e 0,25 g/mL Fungizone). Uma canaleta horizontal, localizada 1 mm abaixo da junção amelodentinária, foi confeccionada com ponta diamantada montada em motor de alta rotação (ambos esterilizados) em ambiente asséptico, sob constante refrigeração. Em capela de fluxo laminar, a porção coronária foi separada da radicular, e o tecido pulpar foi cuidadosamente removido com limas endodônticas e/ou pinça clínica esterilizada. O tecido foi picotado com lâmina de bisturi no 15 e os fragmentos foram submetidos a desagregação enzimática em solução de collagenase tipo 1 (3 mg/mL; Worthington Biochemical Corporation, Lakewood, NJ, EUA). A seguir, as células foram sub-cultivadas em α -MEM completo (suplementado com 100 IU/mL de penicilina, 100 μ g/mL de estreptomicina e 10% de soro fetal bovino, (Gibco, Grand Island, NY, EUA) para a expansão da cultura primária de HDPCs. A identificação de células tronco nesta cultura primária foi realizada por meio de imunofluorescência. As células (passagens 3) foram semeadas em placas de 96 compartimentos (1×10^4 células/compartimento) durante 24 h. Em seguida, as células foram fixadas em paraformaldeído 4%, submetidas a duas lavagens com PBS frio, e permeabilizadas com Triton-X 100 a 0,1% por 10 min. Após 3 lavagens com PBS frio, o bloqueio foi realizado com 5% de albumina de soro bovino (BSA; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA) diluída em PBS, por 30 min, sendo as células incubadas com anticorpos primários (STRO-1, CD-146, CD-44, OCT3/4, Nanog e Nestin) por 12 h a 4°C. Após este período, as células foram incubadas com anticorpo secundário conjugado ao FITC (1:100; Santa Cruz Biotechnology) por 1 h, seguido de incubação com Hoechst (1:5000; Invitrogen, Eugene, Oregon, EUA) por 15 min, para contra-fluorescência nuclear. Após a biomarcação, as células foram analisadas em microscópio de fluorescência (Leica DM 5500B, Nussloch GmbH, Nussloch, Alemanha). Assim, a cultura celular a ser empregada representou uma cultura mista de células pulpares com a presença de uma subpopulação de células mesenquimais indiferenciadas.

7.1 Estabelecimento da cultura 3D: Inicialmente, foi realizada formulação arcabouço 3D sobre o qual as HDPCs foram semeadas. O arcabouço foi composto por uma solução de colágeno tipo 1 (Rat Tail Collagen Type I Solution; Sigma Aldrich) proteína mais abundante no tecido pulpar (90%), meio de cultura α MEM 10x (DMEM; GIBCO, Grand Island, NY, EUA) e hidróxido de sódio [5M] (NaOH). A solução resultante foi transferida para placas de 48 compartimentos e incubadas a 37°C para geleificação por 30 minutos. Em seguida, 3×10^4 células foram semeadas sobre o arcabouço 3D, sendo os conjuntos incubados por 48 horas para crescimento das células no interior da cultura 3D.

7.2 Análise da citotoxicidade trans-amelodentinária: As análises de citotoxicidade foram realizadas de acordo com o item 5, em um modelo experimental onde a cultura 3D de células da polpa dental humana foi colocada em contato direto com a dentina dos discos de esmalte/dentina montado em CPA (Figura 3).

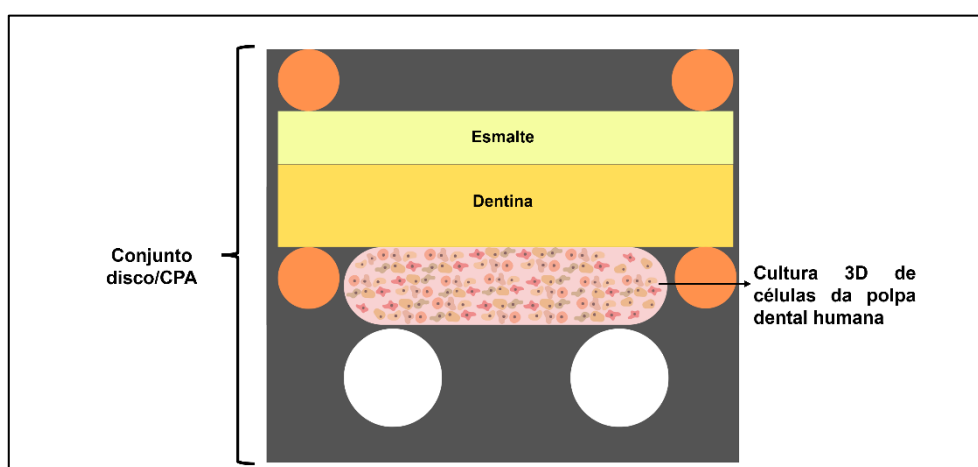


Figura 3. Modelo in vitro de avaliação da citotoxicidade trans-amelodentinária em cultura 3D.

6.3 PCR tempo-real: Imediatamente e 7 dias após a aplicação dos protocolos, o RNA total foi extraído utilizando o protocolo do reagente TRIzol (Invitrogen) seguido de tratamento com DNase (Sigma-Aldrich). Em seguida, 500 μ g de RNA purificado foram utilizados como modelo para a síntese de DNA complementar da primeira fita usando o kit de transcrição reversa de cDNA de alta capacidade (Applied Biosystems, Life Technologies, Foster City, CA, EUA). Reações em cadeia da polimerase em tempo real foram conduzidas usando ensaios de

expressão gênica TaqMan (Applied Biosystems) para amplificar *DSPP* (Hs00171962_m1), *DMP1* (Hs01009391_g1), *TNF* (Hs00174128_m1), *IL1B* (Hs01555410_m1), *PTGS2* (Hs00153133_m1), *IL6* (Hs00174131_m1), *IL8* (Hs_00174103_m1), *TRPA1* (Hs00175798_m1), *PPRAG* (Hs00234592_m1), *HMOX1* (Hs01110250_m1) imediatamente e *DSPP*, *DMP1*, *SPP1* (Hs00959010_m1), *BGLAP* (Hs01587814_g1) e *ALPL* (Hs01029144_m1) após 7 dias. As reações seguiram as condições TaqMan Fast Advanced Master Mix (Applied Biosystems) processadas no sistema StepOnePlus (Applied Biosystems). A expressão relativa (mudança de dobra) para cada gene foi calculada usando equações $2^{-\Delta\Delta C_q}$ com *GAPDH* (Hs02786624_g1) como gene de referência.

Não Autorizo a publicação deste trabalho antes de 19 de agosto de 2026

(Direitos de publicação reservado ao autor)

Araraquara, 19 de agosto de 2024.

Rafael Antonio de Oliveira Ribeiro