



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

JÚLIO DE MESQUITA FILHO

CAMPUS DE ARAÇATUBA

LIDIANE MENDES LOUZADA

**Avaliação histológica do potencial anti-inflamatório do
Carvedilol no tecido pulpar de ratos Wistar após clareação
dentária**

ARAÇATUBA-SP

2016



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
JÚLIO DE MESQUITA FILHO
CAMPUS DE ARAÇATUBA

LIDIANE MENDES LOUZADA

**Avaliação histológica do potencial anti-inflamatório do Carvedilol
no tecido pulpar de ratos Wistar após clareação dentária**

Trabalho de Conclusão de Curso como parte dos requisitos para a obtenção do título de Bacharel em Odontologia da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

Orientador: Prof. Dr. Luciano Tavares Angelo Cintra

ARAÇATUBA-SP

2016

DEDICATÓRIA

A **Deus**, que foi meu maior abrigo e meu guia durante as dificuldades e surpresas da vida. Obrigada meu Deus, por ter me dado uma família maravilhosa, saúde e disposição. Por ter me protegido, ter me garantido serenidade, paciência e perseverança, abrindo-me as portas em todos os momentos em que precisava de luz. Obrigada por estar sempre em meu caminho e colocando ao meu lado pessoas que sempre ajudaram a me levantar nos momentos onde a queda fez parte do aprendizado em minha jornada. Por todas as graças concedidas, por saber que posso Te encontrar em todos os momentos de minha vida, por não permitir que desistisse nesta longa caminhada, por me manter sempre nos melhores caminhos: os Teus caminhos.

Aos meus pais, **Paulo e Cíntia**, pelo amor incondicional, pela confiança e por todos os exemplos de humildade, respeito, dedicação e coragem que me deram. Sem vocês não teria conseguido chegar até aqui. Obrigada por, mesmo longe, serem meu porto seguro e minha fonte de amor inesgotável. Agradeço todos os dias a Deus por ter me dado pais tão maravilhosos, que sempre fizeram o possível e impossível para que eu e meu irmão estivéssemos bem.

Minha eterna gratidão a vocês que sempre estiveram ao meu lado me incentivando. Que por meio de muita renúncia, enorme incentivo e imenso amor compreenderam as minhas escolhas e tornaram possível esta conquista. Que nunca mediram os esforços para me proporcionar tudo o que fosse realmente importante.

Obrigada pela paciência, ajuda, pelas orações e amor único na conquista de mais uma etapa. Espero poder retribuir tudo o que fizeram e fazem por mim.

Vocês me ensinaram que ser feliz é reconhecer que vale a pena viver, apesar dos desafios e dificuldades.

Jamais existirão palavras que descreva tudo o que representam para mim! Tenho orgulho de ser filha de vocês, que são meus maiores exemplos de vida!

Amo muito vocês!

Ao meu amado irmão **Fábio**, que me ensinou desde pequena como ser forte e destemida. Sempre em meu coração e pensamento, agradeço todos os dias por Deus ter colocado você em minha vida como irmão!

Agradeço muito a você por estar sempre perto de casa e poder estar mais perto do pai e da mãe, ajudando eles no que precisavam enquanto eu estava longe. Agradeço pelos incentivos e orações para que eu vencesse mais uma etapa em minha vida. Sei que a ausência, a distância, foi muito difícil no começo, mas com o tempo pudemos sentir como um faz falta ao outro, e a importância de você em minha vida, te amo e agradeço pelo carinho, preocupação e paciência que teve comigo durante essa etapa. Por entender que a minha distância teve um motivo nobre, e por saber que nossa ligação e amizade têm laços inquebráveis. Sem você não teria conseguido chegar hoje até aqui, neste momento tão importante da minha vida e que você teve mérito junto comigo, por ter me escutado todas às vezes, me ajudando e tentando resolver meus problemas e minhas dificuldades aqui, hoje só tenho a te agradecer por mais esta conquista que conseguimos!

Muito obrigada por cuidar do pai e da mãe todos esses anos que estive aqui em Araçatuba e por você existir em minha vida!

Amo muito você meu irmão!

A todos os meus familiares pela torcida. Em especial à minha avó **Esmênia Julia Louzada (*in memorian*)** que teve participação significativa nessa conquista e que nunca deixou de transmitir o amor e a preocupação para com seus netos através de suas orações e ligações, sempre muito especiais. Saudades do seu abraço, dos seus ensinamentos com as mais belas palavras, que jamais me esquecerei. Levo à senhora comigo, no meu coração, aonde quer que eu vá! Exemplo de pessoa e de superação! Amo a senhora para sempre!

Ao meu avô **João de Deus Louzada** pelo grande apoio em todos esses anos, pelo incentivo aos estudos e pelo grande carinho. Amo o Senhor!

À minha avó **Inês Paulina Fabris Mendes** que sempre torceu por nós, obrigada por toda força e ajuda sempre! Amo a senhora!

Ao meu Avô **Jesuíno Mendes Galvão Neto (*in memorian*)** exemplo de pessoa, sempre trabalhando, batalhando e preocupado conosco. Com toda sua calma e paciência nos ensinou a enfrentar as dificuldades da vida sem nunca perder a fé em Deus. Eterna saudade. Amo o senhor para sempre!

À minha prima **Juliana Aparecida Delben** por ter despertado em mim a paixão pela profissão antes mesmo de entrar na universidade, minha eterna gratidão por toda ajuda e por todos os ensinamentos não só em relação à profissão, mas sim sobre a

vida. Orgulho-me de ter você como minha prima, e em breve como colega de profissão. Te amo muito!

A toda a minha família, obrigada por caminharem ao meu lado! Mesmo distante, de alguma forma estiveram presentes nessa caminhada. Agradeço pelas orações, por todo amor e carinho. Amo vocês!

Aos meus colegas e amigos, em especial à minha amiga e irmã do coração **Thais do Santos** que sempre torceu por mim e que mesmo longe sempre se fez presente na minha vida! Obrigada por todas as vezes que me aconselhou me dando forças para que eu conseguisse chegar até aqui! Você faz parte desta conquista. Obrigada pela amizade sincera e pelo carinho de sempre!

Estendo este agradecimento a todos que de alguma maneira sonharam este sonho comigo e tiveram a oportunidade de vivê-lo. Meus sinceros agradecimentos.

Nada Seria possível sem vocês!

*“Ser profundamente amado por alguém nos dá força;
amar alguém profundamente nos dá coragem.”*

Lao-Tse

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador **Prof. Dr. Luciano Tavares Angelo Cintra**, conviver com o senhor foi um grande privilégio e um grande aprendizado! Aprendi que a maior dádiva do professor é proporcionar ao aluno oportunidades que levam ao crescimento, assim sou eternamente grata por este crescimento que me proporcionou, pela oportunidade da convivência, além do privilégio de aprender dia-a-dia, seja na pesquisa, na clínica ou no meu crescimento enquanto ser humano. Obrigada pela confiança depositada em mim. Agradeço a Deus a possibilidade de aprender com o senhor e levarei para sempre o seu exemplo de dignidade, ética, dedicação e humanidade. Minha eterna gratidão!

À querida **Francine Benetti**, por sua disponibilidade em me ajudar nesta pesquisa, uma doutoranda extremamente competente que pude conhecer e admirar, um exemplo de pesquisadora e ser humano. Pessoa determinada, que sempre está disposta a nos ajudar e que vou guardar para sempre no meu coração! Você me ensinou muito durante toda a minha iniciação científica e nas clínicas. Uma ótima companhia que eu sempre pude contar. Agradeço imensamente pela confiança, paciência, preocupação e carinho comigo. Por me proporcionar aprendizado constante e partilhar do privilégio da sua convivência. Você é muito especial, e espero que nossa amizade permaneça sempre!

Ao professor **Ricardo Coelho Okida**, agradeço pelo conhecimento partilhado sempre, por seus ensinamentos transmitidos com a sabedoria e simplicidade de um grande mestre. Jamais esquecerei tudo o que fez e faz por seus alunos, nos ensinando sempre, pelo carinho e por sua grande amizade!

Às alunas de iniciação científica **Marina Carminatti, Juliana Maria, Jéssica Galbiati, Letícia**, e a todos do **Departamento de Odontologia Restauradora** por dividirem comigo a experiência com as pesquisas na área de endodontia, por toda ajuda, pelo espírito de equipe formado e pelas alegrias compartilhadas. Obrigada pela sempre agradável convivência que tivemos.

Aos amigos que a Odontologia me deu, pelos bons momentos vividos. Um agradecimento especial para meus amigos, **Fred, Emilie, Cecilia, Camila, Érica, Christine, Denise, Janaína, Caio e João**. A amizade de vocês é muito importante e será algo que levarei no meu coração, por toda a minha vida!

Vocês contribuíram muito em todo meu aprendizado e caminhada nestes anos. Agradeço pela oportunidade de conhecer pessoas maravilhosas e pela amizade de cada um de vocês.

À Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, na pessoa do diretor **Prof. Titular Wilson Roberto Poi** e do Senhor Vice-Diretor **Prof. Tit. João Eduardo Gomes Filho** por proporcionarem a realização desta pesquisa e crescimento profissional, pela oportunidade de realização do curso de Graduação.

A todos os funcionários de todos os setores da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, por proporcionarem o conforto e o bom funcionamento desta instituição.

Aos professores da Graduação da Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba – UNESP, pelos ensinamentos durante todo o decorrer do curso.

A todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram durante todo o decorrer do curso e que passaram em minha vida e colaboraram no desenvolvimento da pessoa que hoje sou.

Mais uma vez, agradeço a **Deus**, ser superior, por ter me concedido essa oportunidade e ter colocado todas essas pessoas maravilhosas em meu caminho.

OBRIGADA!

EPÍGRAFE

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.”

José de Alencar

LOUZADA, L.M. **Avaliação histológica do potencial anti-inflamatório do Carvedilol no tecido pulpar de ratos Wistar após clareação dentária.** 2016. 41 f. Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2016.

RESUMO

O Carvedilol, medicamento antioxidante e anti-inflamatório, foi descrito por diminuir citocinas pró-inflamatórias na periodontite. O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) do gel clareador gera danos à polpa que variam de inflamação à necrose. Este estudo avaliou o potencial anti-inflamatório do Carvedilol em polpa de molares de ratos, após clareação dentária. Os molares superiores direito de 28 ratos Wistar receberam Whiteness HP Maxx H_2O_2 35% (1x30 min), e os esquerdos serviram de controle. Metade dos animais recebeu gel de Carvedilol (1x10 min), formando os grupos (n=7): Cla - clareado; Cla+Carv - clareado seguido do Carvedilol; Controle - sem tratamento. Aos 2 e 30 dias, os ratos foram mortos para avaliação em H.E., e os dados submetidos aos testes de Kruskal Wallis e Dunn ($p < 0,05$). Aos 2 dias, o grupo Cla apresentou necrose no terço oclusal da polpa coronária na maior parte dos espécimes, e Cla+Carv, inflamação severa ($p > 0,05$), com diferença quando comparados ao controle ($p < 0,05$). No terço médio, Cla apresentou inflamação severa, e Cla+Carv, moderada ($p > 0,05$), com diferença apenas entre Cla e Controle ($p < 0,05$). No terço cervical, Cla apresentou inflamação moderada, e Cla+Carv, leve ($p > 0,05$). A diferença manteve-se apenas entre Cla e Controle ($p < 0,05$). Aos 30 dias, houve ausência de inflamação em todos os grupos ($p > 0,05$), e acentuada quantidade de dentina terciária nos dentes clareados, independente a aplicação do Carvedilol ($p > 0,05$). Concluiu-se que o gel de Carvedilol apresenta potencial de minimizar os danos do H_2O_2 , especialmente em regiões mais profundas da polpa dentária de ratos Wistar após procedimento clareador.

Palavras Chave: Clareação dentária. Carvedilol. Inflamação pulpar.

LOUZADA, L.M. **Potential histological evaluation of anti-inflammatory Carvedilol in the pulp tissue of Wistar rats after dental bleaching.** 2016. 41 f. Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2016.

ABSTRACT

Carvedilol, antioxidant and anti-inflammatory drug, was described by decreasing proinflammatory cytokines in periodontitis. The hydrogen peroxide (H_2O_2) of bleaching gel generates damage to the pulp ranging from inflammation to necrosis. This study evaluated the antiinflammatory potential of Carvedilol pulp of rat molars after dental bleaching. The molars duty of 28 Wistar rats received Whiteness HP Maxx H_2O_2 35% (1x30 min), and the left served as the control. Half of the animals received Carvedilol gel (1x10 min), forming groups (n=7): Ble - bleached; Ble+Carv - bleached followed by Carvedilol; Control - no treatment. After 2 and 30 days, the rats were killed for evaluation H.E., and the data subjected to the Kruskal-Wallis test and Dunn ($p < 0.05$). After 2 days, the Ble group showed necrosis in the occlusal third of the coronal pulp in most specimens, and Ble+Carv, severe inflammation ($p > 0.05$), with a difference when compared to control ($p < 0.05$). In the middle third, Ble showed severe inflammation and Ble+Carv, moderate ($p > 0.05$), with only difference between Ble and control ($p < 0.05$). In the cervical third, Ble showed moderate inflammation, and Ble+Carv, mild ($p > 0.05$). The difference remained only between Ble and control ($p < 0.05$). At 30 days, there was no inflammation in all groups ($p > 0.05$), and a marked amount of tertiary dentin in teeth bleached independent application of Carvedilol ($p > 0.05$). It was found that the gel Carvedilol has the potential of minimizing H_2O_2 damage, especially in deep regions of dental pulp of Wistar rats after bleaching procedure.

Keywords: Dental bleaching. Carvedilol. Pulp inflammation.

LISTAS DE FIGURAS

Páginas

Figura 1. Gel de Carvedilol e gel clareador utilizados no experimento 21

Figura 2. Imagens da sessão clareadora e terapêutica 21

Figura 3. Divisão em terços da câmara pulpar 24

Figura 4. Imagens representativas de espécime dos grupos aos 2 dias 26

Figura 5. Imagens representativas de espécime dos grupos aos 30 dias 27

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Páginas

Tabela 1. Distribuição dos grupos experimentais de acordo com o tratamento realizado 20

Tabela 2. Escores atribuídos ao infiltrado inflamatório no tecido pulpar aos 2 dias, de acordo com cada grupo. 29

Tabela 3. Média da área central da câmara pulpar de cada grupo aos 30 dias 29

LISTA DE ABREVIATURAS

H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio

CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais

FOA – Faculdade de Odontologia de Araçatuba

EDTA – Ácido Etilenodiaminotetracético

Cont – Controle

Cla – Clareado

Carv – Carvedilol

Kg – Kilograma

mg – Miligrama

H.E. – Hematoxilina e Eosina

Fig. – Figura

Tab. – Tabela

n – Número

µm – Micrômetro

mmol/L – Milimol por litro

ug/mL – Micrograma por mililitro

min – minutos

SUMÁRIO

Páginas

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA 15

2. OBJETIVO 18

3. MATERIAL E MÉTODOS 19

4. FORMA DE ANÁLISE DOS RESULTADOS 23

5. RESULTADOS 25

6. DISCUSSÃO 30

7. CONCLUSÃO 34

REFERÊNCIAS 35

ANEXOS 41

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A clareação dentária tornou-se muito popular nos últimos anos devido ao apelo estético por dentes mais claros, constituindo uma solução para pacientes que apresentam pigmentações dentárias (EIMAR et al., 2012).

Diferentes métodos e posologias têm sido descritos para se clarear dentes vitais (HAYWOOD & HEYMANN, 1989), seja através da técnica de consultório, ou da caseira. A técnica de consultório emprega o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em altas concentrações (20-38%) associado ou não a fontes de luz, sendo que a técnica caseira utiliza o peróxido de carbamida (6-22%), ou H_2O_2 em baixas concentrações (3-12%), associado a moldeiras de acetato (BUCHALLA et al., 2007).

Independentemente do método utilizado para clarear dentes com vitalidade, todos tem como base o uso de H_2O_2 ou seu precursor, o peróxido de carbamida (BARGHI, 1998). O H_2O_2 dissocia-se em espécies reativas de oxigênio, potentes agentes oxidantes, que definem o mecanismo clareador como sendo uma reação de oxidação em que a substância a ser clareada doa elétrons ao agente clareador. Estas espécies reativas de oxigênio tem a capacidade de penetrar por esmalte e dentina, reagindo com moléculas orgânicas lá existentes (HANNIG et al., 2011; CAMPS et al., 2010; CARRASCO-GUERISOLI et al., 2009; CAMPS et al., 2007; BENETTI et al., 2004; KORYTOWSKI & SARNA, 1990), podendo atingir o complexo dentino-pulpar (COSTA et al., 2010; GOLDSTEIN et al., 1994).

Aproximadamente 52% dos pacientes que se submetem a este tipo de tratamento estético relatam sensibilidade dentária pós-operatória (HAYWOOD et al., 1994). Embora a dor nos dentes clareados possa ser provocada por estímulos térmicos ou outros, a maioria dos pacientes se queixam de “formigamento”, “agulhada” ou “choques” (CHARAKORN et al., 2009; HAYWOOD, 2005), assim como discutido por Markowitz (2010). A dor após tratamentos clareadores também pode afetar dentes hígidos, ao contrário da sensibilidade comum, onde a dor ocorre em dentina exposta (MARKOWITZ et al., 2010). Esta sensibilidade pode estar diretamente ligada ao contato do H_2O_2 com o complexo dentino-pulpar.

Histologicamente podem ser observados eventos inflamatórios de diversos graus no tecido pulpar de dentes submetidos a este procedimento estético (CINTRA

et al., 2016; CINTRA et al., 2013; SEALE et al., 1981), que já foram observados em dentes humanos (COSTA et al., 2010).

Não se sabe ao certo por quanto tempo as espécies reativas de oxigênio liberadas pelo agente clareador podem continuar agindo e penetrando no tecido pulpar. Acredita-se que mesmo após a remoção do agente clareador sobre as estruturas dentárias, essas espécies reativas permaneçam aprisionadas, agindo por mais tempo do que o necessário. Neste intuito, seria importante a utilização de agentes antioxidantes após o uso do clareador, que eliminariam o H₂O₂ remanescente, bem como suas espécies reativas de oxigênio, cessando o efeito deste sobre as estruturas dentárias.

Assim, a inflamação gerada ao tecido pulpar pelo agente clareador, bem como a possível estimulação das células pulpares pelo H₂O₂, possa ser amenizada, diminuindo a quantidade de dentina terciária encontrada 30 dias após o procedimento clareador (CINTRA et al., 2016).

Alguns agentes antioxidantes já estão sendo testados após procedimento de clareação dentária (VARGAS et al., 2014; LIMA et al., 2010; MAY et al., 2010; SASAKI et al., 2009). No entanto, nenhum dos agentes antioxidantes foi capaz de neutralizar completamente os efeitos danosos provenientes do tratamento clareador.

O Carvedilol é um medicamento conhecido na medicina por exercer efeito antioxidante (AKBAS et al., 2005) e anti-inflamatório (ARAÚJO JUNIOR et al., 2013). Por ser um bloqueador β-adrenérgicos não-específico, é utilizado de forma segura no tratamento de hipertensão, insuficiência cardíaca congestiva e doença coronária (ARAB & SAWALHI, 2013), sendo que já foi demonstrado seu efeito cardioprotetor (ZHU et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2004), nefroprotetor (SINGH et al., 2003) e hepatoprotetor (HAMDY & DEMERDASH, 2012).

Ainda, foi relatado que possui efeitos antiartríticos, por atenuar a migração de leucócitos e suprimir citocinas pró-inflamatórias em ratos (ARAB & SAWALHI, 2013). Também foi associado a um aumento da produção de citocinas anti-inflamatórias (ARAÚJO JUNIOR et al., 2013). Outro achado interessante mostra que animais diabéticos tratados com Carvedilol apresentaram redução da diabetes, associada com diminuição de doença óssea, o que pode ser atribuído ao seu mecanismo antioxidante (GOTO et al., 2011).

O tratamento com Carvedilol em ratos também se mostrou capaz de diminuir a resposta inflamatória na doença periodontal, observando-se redução dos níveis de COX-2, uma enzima expressa em tecidos inflamados, além de reduzir os níveis das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-1 β . Ainda, o mesmo estudo demonstrou que este medicamento foi capaz de reduzir significativamente a presença de enzimas proteolíticas liberadas pelas células associadas com destruição dos tecidos em doenças periodontais (ARAÚJO JUNIOR et al., 2013).

Assim, conhecendo as propriedades do Carvedilol, propomos estudar sua possível ação anti-inflamatória sobre a polpa de molares de ratos clareados, visando uma terapia para minimizar os efeitos danosos do H₂O₂ sobre os tecidos dentários, promovendo um tratamento mais seguro para pacientes que desejam clarear seus dentes. A hipótese do estudo é que dentes clareados que receberão o Carvedilol apresentem tecido pulpar com menores alterações, quando comparados aos que não receberam o anti-inflamatório.

2. OBJETIVO

Investigar o potencial anti-inflamatório do Carvedilol sobre o tecido pulpar quando aplicado topicamente em molares de ratos Wistar após a clareação dentária.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Material

Animais

Foram utilizados 28 ratos machos (*Rattus albinus*, Wistar), pesando aproximadamente 280g, provenientes do biotério da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP. Os animais foram mantidos em ambiente com temperatura entre 22 e 24°C com ciclo de luz controlada (12 horas claro e 12 horas escuro) e em gaiolas coletivas, quatro ratos por gaiola, alimentados durante todo o período experimental com dieta sólida e água “ad libitum”, exceto nas primeiras 24 horas após a intervenção. Os procedimentos experimentais foram submetidos à Comissão de Ética no Uso de Animais da FOA, tendo sido aprovado (CEUA nº 00631-2015).

Drogas empregadas

Para anestesia dos animais foi utilizado via intramuscular um sedativo à base de Cloridrato de Xilazina 2% (Xilazin, Syntec do Brail LTDA – Cotia, São Paulo, Brasil) e um anestésico à base de Cloridrato de Cetamina a 10% (Ketamina Agener 10%, União Química Farmacêutica Nacional S/A – Embu-Guaçu, São Paulo, Brasil). Para eutanásia, foi utilizado um anestésico via peritoneal à base de tiopental sódico (Thiopentax, Cristália – Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda. – Itapira, Brasil).

Agente Clareador

Foi utilizado o produto clareador disponível no mercado, à base de H₂O₂ a 35%, Whiteness HP Maxx (FGM Produtos Odontológicos) (Fig. 1) (CINTRA et al. 2016; 2013). Este produto apresenta-se comercialmente em dois frascos, um contendo o peróxido e o outro, o agente espessante, sendo estas substâncias misturadas na proporção de 3:1.

Agente Terapêutico

Como terapia foi utilizado o gel de Carvedilol 2,5% (Produto manipulado: Carvedilol 2,5%/Veículo suspensor qsp; Fig. 1) (ARAÚJO JUNIOR et al., 2013).

3.2 – Métodos

Divisão em grupos

Os grupos experimentais foram divididos de acordo com o tratamento realizado, e podem ser visualizados na tabela 1.

Tabela 1. Distribuição dos grupos experimentais de acordo com o tratamento realizado

Grupos	Clareação dentária	Procedimento pós-clareação	Tempos de análise	n (hemi-maxilas)
Controle	-----	-----	2 e 30 dias	7
Cla	1 aplicação de 30 minutos do gel clareador	-----	2 e 30 dias	7
Cla+Carv	1 aplicação de 30 minutos do gel clareador	1 aplicação de 10 minutos do Carvedilol	2 e 30 dias	7

Procedimentos clareadores

Todos os animais foram anestesiados via intramuscular com uma associação do Cloridrato de Xilazina 2% (relaxante muscular, analgésico e sedativo), na dosagem de 10mg por Kilograma de peso corporal, e o anestésico Cloridrato de Cetamina a 10%, na dosagem de 80mg por Kilograma de peso corporal.

Após anestesia, foi realizada a aplicação e foto-ativação da barreira gengival resinosa (Top Dam – FGM Produtos Odontológicos – Joinville, Santa Catarina, Brasil) ao redor dos molares superiores e, em seguida, foi aplicado aproximadamente 0,01mL de H₂O₂ 35% sobre os molares do lado direito de cada animal, permanecendo em contato com o esmalte por 30 minutos (CINTRA et al., 2016). Posteriormente, a superfície do dente clareado foi limpa com algodão e papel absorvente e lavada abundantemente com água.

Os molares do lado esquerdo formaram os grupos controles, e não receberam qualquer tratamento clareador.

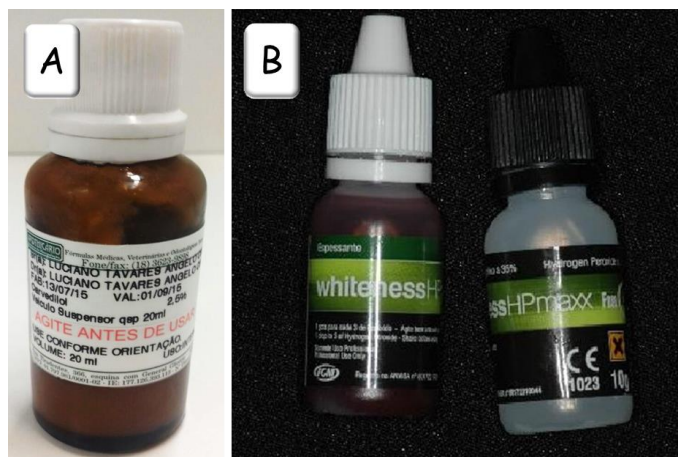


Figura 1. A: Gel de Carvedilol e B: gel clareador utilizados no experimento.

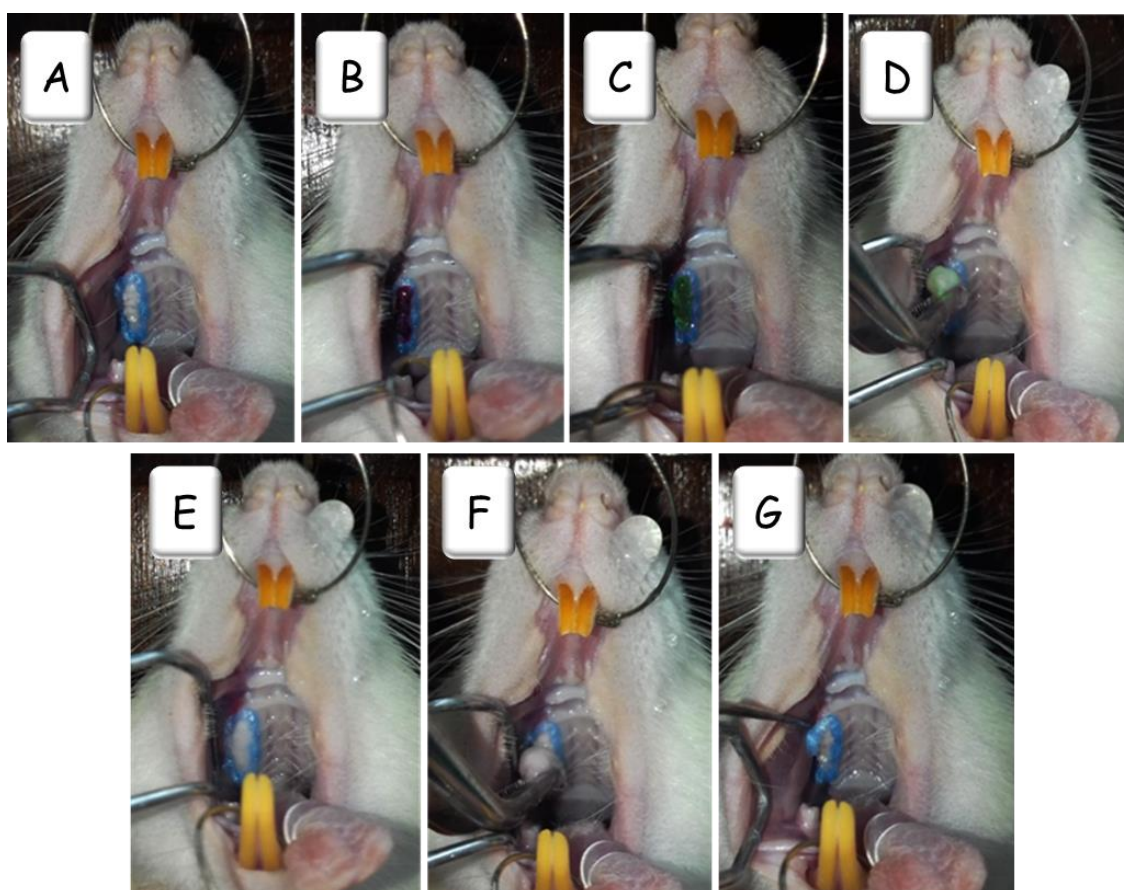


Figura 2. Imagens da sessão clareadora e terapêutica. A: aplicação da barreira gengival; B e C: aspecto inicial e final do gel clareador sobre os molares superiores do rato; D: remoção do gel clareador; E: aplicação do gel de Carvedilol; F: remoção do gel de Carvedilol; G: remoção da barreira gengival.

Procedimentos pós-clareação

Após o procedimento clareador descrito acima, foi aplicada a solução de Carvedilol no volume aproximado de 0,01mL permanecendo durante 10 min sobre os molares direito e esquerdo de metade dos animais. Os dentes foram lavados para a completa remoção do Carvedilol, e por fim, a barreira gengival foi retirada.

Eutanásia e processamento laboratorial

Decorrido o período pré-determinado de 2 e 30 dias (CINTRA et al., 2016) após a sessão clareadora, os animais foram mortos com 240mg/Kg de Tiopental sódico (anestésico).

Após morte, foi removida toda a pele correspondente à face direita do animal e com dois cortes realizados com tesoura no ângulo da boca, foi realizada a separação da mandíbula e maxila. Empregando uma lâmina intercambiável nº15, montada em cabo de bisturi, foi realizada uma incisão em profundidade no palato do animal ao nível do plano sagital mediano acompanhando a sutura intermaxilar, separando a maxila direita da esquerda. Separadas as maxilas e, empregando-se novamente uma tesoura, foi realizado outro corte de modo a tangenciar a face distal dos molares superiores direito, possibilitando a obtenção da hemimaxila direita e esquerda contendo os dentes posteriores, objeto do estudo.

As hemimaxilas foram colocadas imediatamente em frascos individuais devidamente identificados, contendo solução de formalina a 10%, tamponada com pH neutro, durante as primeiras 18 horas e depois lavadas em água corrente por um período de 12 horas para a remoção de toda solução de fixação. Após a fixação as peças foram desmineralizadas em solução de EDTA a 10%, por aproximadamente 3 meses. Posteriormente, as hemimaxilas foram lavadas em água corrente, por 12 horas, desidratadas em álcool, diafanizadas em xilol e incluídas em parafina.

A orientação no momento da inclusão permitiu a realização de cortes teciduais dos molares superiores e estruturas de suporte em seu sentido longitudinal. Os cortes histológicos, de cada amostra foram selecionados a partir do momento em que a raiz mesial dos primeiros molares foi observada em toda a sua extensão longitudinal. As peças foram posicionadas no plano mesio-distal, e os cortes semi-seriados foram realizados no sentido vestibulo-palatino, com 5 µm de

espessura, realizados em micrótomo (RM 2045, Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha).

4. FORMA DE ANÁLISE DOS RESULTADOS

4.1 – Análise histológica

Para fins de padronização, foi selecionada a raiz mesial em cortes que proporcionaram a visualização desta raiz em seu sentido longitudinal pleno. Para cada espécime, 2 lâminas com 3 cortes teciduais cada foram preparadas e coradas com Hematoxilina e Eosina (LILLIE, 1954). Na sequência, foi realizada a análise microscópica em microscópio óptico (DM 4000 B, Leica®, Germany). Os resultados da análise histológica foram expostos por meio de duas análises, sendo uma descritiva e outra qualitativa, referentes a cada grupo experimental.

Análise descritiva

As lâminas contendo os cortes mais representativos de cada espécime foram avaliadas sob a microscopia óptica e utilizadas na análise descritiva. A análise microscópica descritiva da reação do tecido pulpar frente ao processo de clareação dentária consistiu na descrição dos fenômenos histopatológicos, procurando caracterizá-los globalmente em função das variáveis experimentais.

Análise qualitativa

A análise qualitativa consistiu na avaliação do infiltrado inflamatório, atribuindo magnitudes registradas sob a forma de escores de 1 a 5, gerando dados para análise estatística por meio do Software Pacotico (Microsoft Visual FoxPro, Direitos: Eymar Sampaio Lopes).

O processo inflamatório foi analisado de forma semelhante ao realizado no projeto anterior (adaptado de CINTRA et al., 2013), considerando sua intensidade e distribuição no tecido pulpar, em conformidade com o número médio aproximado de células inflamatórias presentes nos diferentes terços, de um mesmo espécime, examinados em aumento de 400X. Os escores atribuídos em cada terço foram:

- 1 – Células inflamatórias ausentes ou em número desprezível;
- 2 – Infiltrado inflamatório discreto (menos de 25 células por campo);

- 3 – Infiltrado inflamatório moderado (entre 25 e 125 células por campo);
- 4 – Infiltrado inflamatório severo (mais que 125 células por campo);
- 5 – Necrose

A avaliação microscópica foi efetuada por um observador cego calibrado que determinou os escores para cada espécime.

Com a finalidade de facilitar a atribuição dos escores e tornar esse ato menos subjetivo, a câmara pulpar foi subdividida em terços (Oclusal, Médio e Cervical), conforme ilustração contida na Figura 3. Assim, analisamos os terços da coroa de cada elemento dentário. Desta forma, foi possível uma análise comparativa entre os grupos, considerando a intensidade e extensão do processo inflamatório.

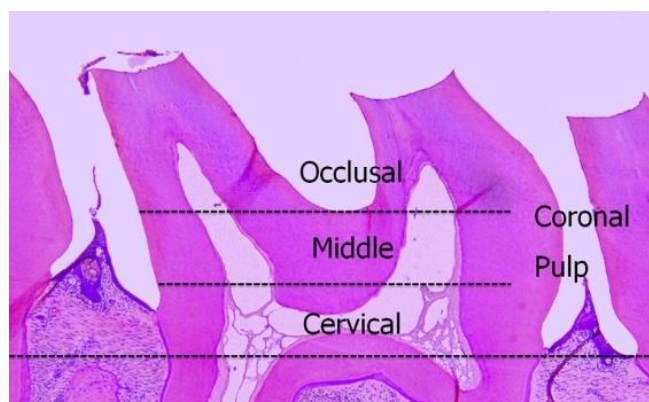


Figura 3. Divisão em terços da câmara pulpar (original de Cintra *et al.* 2013).

4.2 – Análise estatística

De posse dos dados obtidos na forma de escores foi realizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis (SIEGEL *et al.*, 1956). Esse teste comparou os 3 grupos entre si, para posteriormente, quando observada alguma diferença significativa, realizar o cruzamento entre os grupos, dois a dois, pelo teste de comparações múltiplas de Dunn (DUNN, 1958). Para todos os teste empregados foi considerado o nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

5. RESULTADOS

5.1 Análise histológica aos 2 dias

Controle – Sem tratamento

Os espécimes deste grupo apresentaram tecido pulpar com características de normalidade em todos os terços da câmara pulpar, apresentando camada de odontoblastos íntegra, em continuidade com as camadas de pré-dentina e dentina. Não foram encontradas células inflamatórias em meio ao tecido organizado em todos os espécimes (Fig. 4 – a, b; Tab. 2). Este grupo nos serviu como controle para identificar as alterações do tecido pulpar nos demais grupos experimentais.

Cla - Agente Clareador

Os espécimes deste grupo apresentaram necrose do tecido pulpar no terço oclusal da polpa coronária, com infiltrado inflamatório severo subjacente, com exceção de um espécime que não apresentou necrose nesta região. No terço médio, a maior parte dos espécimes apresentou infiltrado inflamatório moderado a severo, com permanência de desorganização celular. No terço cervical, ainda foi encontrado infiltrado inflamatório moderado na maior parte dos espécimes (Fig. 4 – c, d; Tab. 2).

Cla+Carv - Agente Clareador seguido do Carvedilol

A maior parte dos espécimes deste grupo apresentou infiltrado inflamatório severo em meio à desorganização do tecido pulpar no terço oclusal. No terço médio foi observado permanência da desorganização celular, com inflamação moderada. No terço cervical, a maior parte dos espécimes apresentou infiltrado inflamatório discreto, e tecido pulpar mais organizado (Fig. 4 – e, f; Tab. 2).

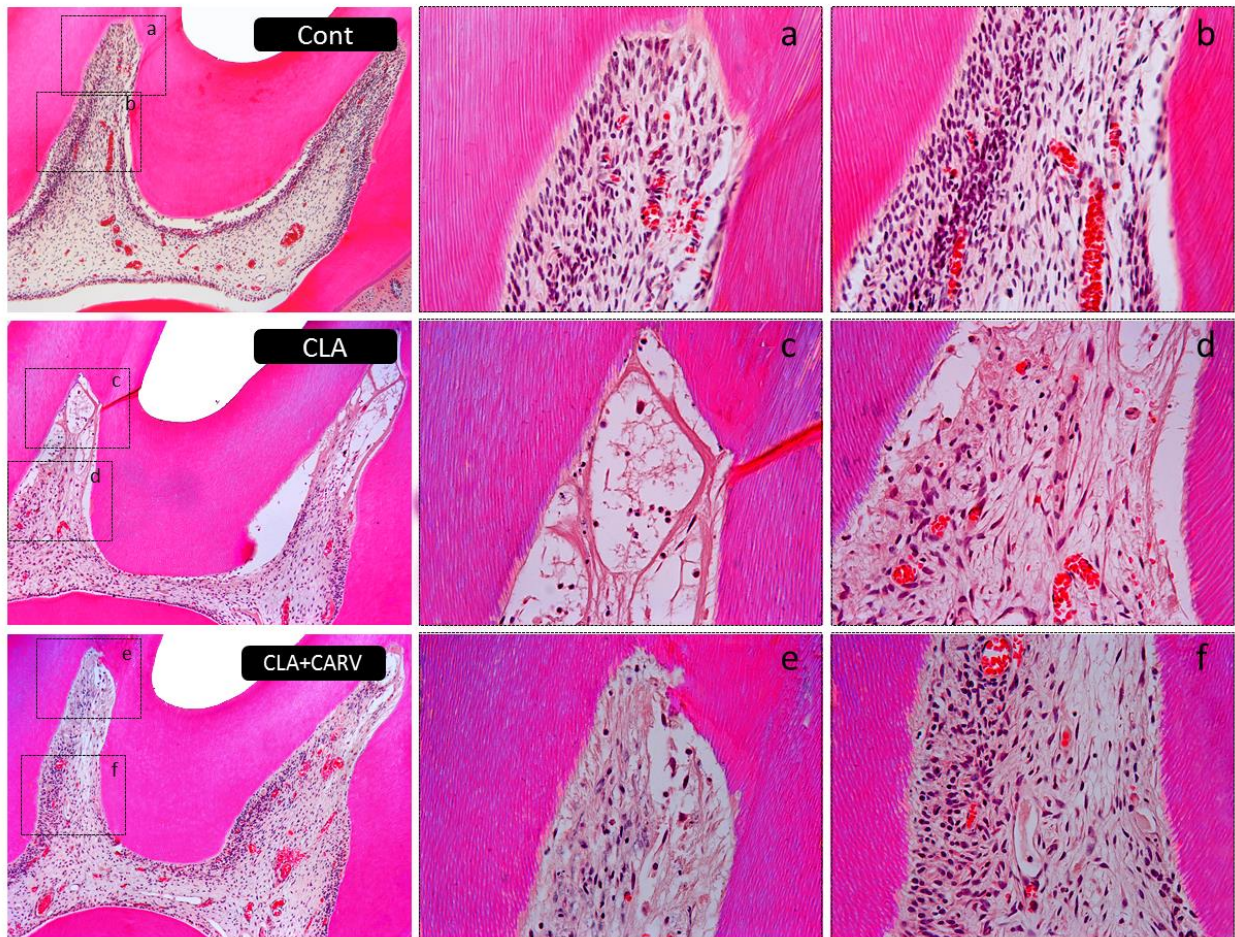


Figura 4. Imagens representativas de espécime dos grupos aos 2 dias. **Cont:** Aspecto microscópico panorâmico da polpa dentária evidenciando ausência de inflamação na polpa coronária, em meio do tecido organizado; **(a,b)** Região de corno pulpar e de terço médio da câmara pulpar, respectivamente, evidenciando camadas celulares organizadas e ausência de inflamação. **CLA:** Aspecto microscópico panorâmico da polpa dentária evidenciando inflamação severa na polpa coronária, e áreas de necrose; **(c)** Região de corno pulpar evidenciando áreas de necrose e diminuição da celularidade; **(d)** Região de terço médio da câmara pulpar apresentando grande desorganização das camadas celulares e presença de células inflamatórias. **CLA+Carv:** Aspecto microscópico panorâmico da polpa dentária com presença de infiltrado inflamatório e tecido pulpar parcialmente desorganizado; **(e)** Região de corno pulpar evidenciando desorganização celular e presença de células inflamatórias; **(f)** Região de terço médio da câmara pulpar com desorganização parcial da camada odontoblástica e presença de células inflamatórias. [100x; 400x - H.E.]

5.2 Análise histológica aos 30 dias

Neste período, não foi encontrado infiltrado inflamatório no tecido pulpar dos espécimes de cada grupo: todos os espécimes apresentaram escore 1 em todos os terços da polpa coronária, tendo camada de odontoblastos organizada ao redor de toda a polpa, assim como as demais camadas.

Porém, nos espécimes que receberam o agente clareador, foi observada dentina terciária em grande parte da câmara pulpar, diminuindo sua área central (Fig. 5 – c, d, e, f).

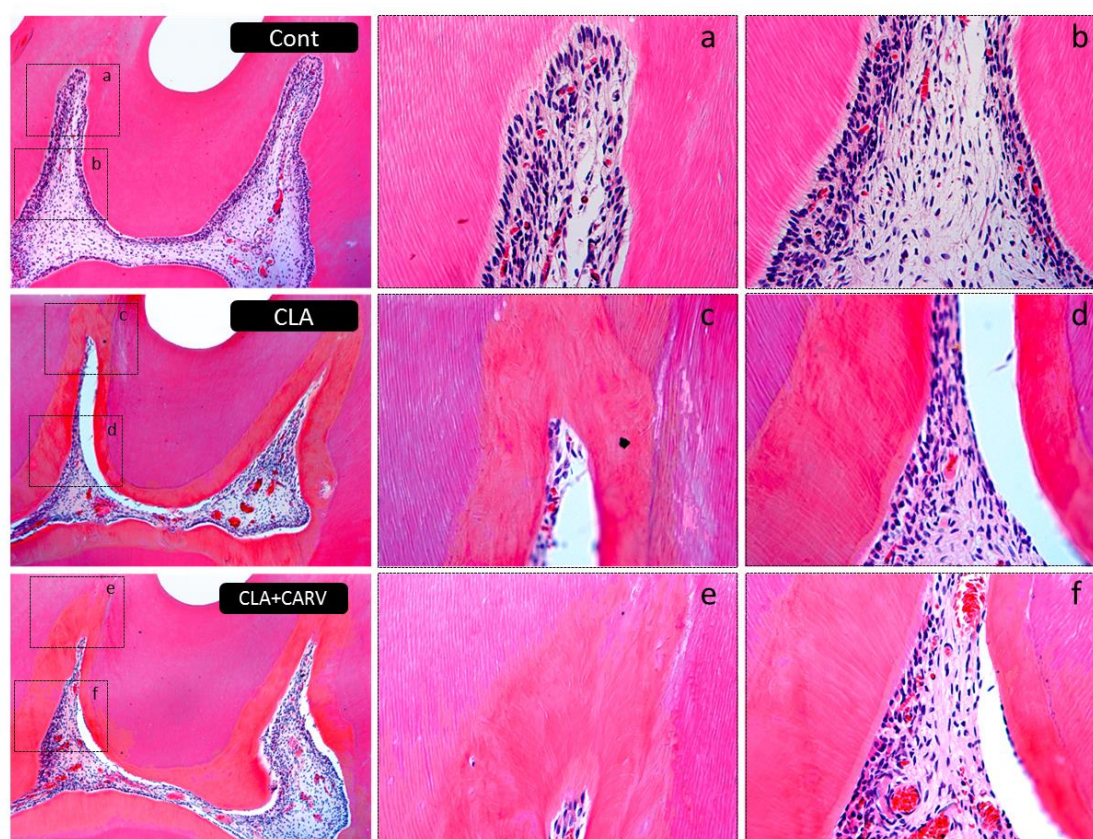


Figura 5. Imagens representativas de espécime dos grupos aos 30 dias. **Cont:** Aspecto microscópico panorâmico da polpa dentária com características de homeostasia; **(a,b)** Região de terços oclusal e médio, respectivamente, evidenciando organização celular e ausência de inflamação. **Cla e Cla+Carv:** Aspecto microscópico panorâmico da polpa dentária dos grupos clareados, demonstrando presença de dentina terciária e tecido pulpar organizado; **(c,e)** Região de terço oclusal evidenciando grande quantidade de dentina terciária; **(d,f)** Região de terço médio demonstrando tecido pulpar organizado e presença de dentina terciária. [100x; 400x - H.E.]

Análise quantitativa da dentina terciária

A quantidade de dentina terciária, observada 30 dias após o procedimento clareador, foi avaliada nas imagens histológicas medindo-se a área correspondente à câmara pulpar de cada grupo, e aplicando-se os testes estatísticos nestes valores de área. Ainda, calculamos a porcentagem da diminuição da área central da câmara pulpar dos grupos clareados, subtraindo os valores de área destes grupos dos valores obtidos no grupo controle (CINTRA et al., 2016). Esses dados podem ser observados na tabela 3.

5.3 – Análise estatística

Os escores atribuídos ao infiltrado inflamatório foram comparados entre os grupos, e estão apresentados na Tabela 2.

Aos 2 dias, ao comparar os grupos clareados entre si, foi observado que o grupo Cla apresentou necrose no terço oclusal da polpa coronária na maior parte dos espécimes, e o grupo Cla+Carv, inflamação severa, porém sem diferença significativa entre eles ($p>0,05$). Ambos foram diferentes quando comparados ao controle ($p<0,05$). Já no terço médio, a diferença foi observada apenas comparando o grupo Cla, que apresentou inflamação severa, com o grupo controle ($p<0,05$). Não foi observada diferença significativa entre os grupos Cla+Carv e Controle ($p>0,05$). No terço cervical, os resultados estatísticos foram semelhantes ao terço médio: grupo Cla, que apresentou inflamação moderada, foi diferente do grupo controle ($p<0,05$); não foi observada diferença entre grupo Cla+Carv, que apresentou inflamação leve, com controle ($p>0,05$).

Aos 30 dias não houve infiltrado inflamatório em nenhum espécime (dados não mostrados na tabela), portanto não houve diferença significativa entre os grupos. Neste período, a câmara pulpar teve sua área central reduzida cerca de 50% nos grupos clareados, sendo semelhantes entre si ($p>0,05$), e diferentes do controle ($p<0,05$) (Tab. 3).

Tabela 2. Escores atribuídos ao infiltrado inflamatório no tecido pulpar aos 2 dias, de acordo com cada grupo

Terço	Escore	Grupos			P
		CONT	CLA	CLA+CARV	
Oclusal	1	7/7	0/7	0/7	<0,001
	2	0/7	0/7	0/7	
	3	0/7	0/7	0/7	
	4	0/7	1/7	5/7	
	5	0/7	6/7	2/7	
	Mediana*	1 ^a	5 ^b	4 ^b	
Médio	1	7/7	0/7	0/7	<0,001
	2	0/7	0/7	2/7	
	3	0/7	1/7	4/7	
	4	0/7	4/7	1/7	
	5	0/7	2/7	0/7	
	Mediana*	1 ^a	4 ^b	3 ^{ab}	
Cervical	1	7/7	0/7	1/7	<0,001
	2	0/7	2/7	5/7	
	3	0/7	5/7	1/7	
	4	0/7	0/7	0/7	
	5	0/7	0/7	0/7	
	Mediana*	1 ^a	3 ^b	2 ^{ab}	

*Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa nas linhas (p<0,05).

Tabela 3. Média da área central da câmara pulpar de cada grupo aos 30 dias

Grupo	Média (10 ⁵)*	DP (10 ⁵)	% Redução	n	P
CONT	15,32 ^a	2,74	0,00	7	<0,001
CLA	7,80 ^b	0,88	48,50	7	
CLA+CARV	7,92 ^b	1,24	48,30	7	

*Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa (p<0,05).

6. DISCUSSÃO

Da metodologia

Nosso grupo de pesquisa tem trabalhado com modelo experimental *in vivo*, utilizando molares superiores de ratos Wistar, machos e adultos jovens, para avaliar os efeitos do gel clareador sobre o tecido pulpar (Cintra et al. 2013; Cintra et al. 2016; Cintra et al. 2016a). O presente estudo teve o objetivo de analisar os possíveis efeitos benéficos de um agente anti-inflamatório, o Carvedilol, no tecido pulpar após clareação dentária neste modelo experimental.

Estudos *in vivo* são importantes, pois são os que melhor representam a realidade clínica: dentes com polpas dentárias vitais apresentam extensões citoplasmáticas dos odontoblastos e o fluido dentinário, que podem impedir ou dificultar a penetração das espécies reativas de oxigênio, provenientes do gel clareador (HANKS et al., 1993). Ainda, possuem sistemas de defesa como enzimas antioxidantes, que protegem as células pulpares do estresse oxidativo (ESPOSITO et al., 2003). Estas enzimas agem degradando o H_2O_2 , minimizando os efeitos citotóxicos do agente clareador.

Em um estudo anterior (CINTRA et al., 2016), vimos que um gel com concentração maior de H_2O_2 (35%) exige um tempo menor de aplicação sobre a superfície do esmalte de molares de ratos, quando comparado ao tempo de aplicação de uso clínico em humanos. Isto para que se consiga minimizar os efeitos deletérios ao tecido pulpar desses animais, e assim nos permitir estudar terapias que possam reduzir estes danos.

Dessa maneira, definimos um protocolo com uma aplicação de 30 minutos do agente clareador sobre o molar do rato, no lugar de três aplicações seguidas de 15 minutos cada, como recomenda o fabricante (CINTRA et al., 2016). Este protocolo clareador gera danos ao tecido pulpar de ratos que são semelhantes aos relatados em incisivos inferiores humanos (COSTA et al., 2010).

Ainda, o uso de ratos para uma pesquisa experimental apresenta vantagens, como a facilidade de manipulação e de reprodução, o tempo de vida, tamanho, peso, custo, armazenagem, alimentação, controle e previsibilidade (FONTES et al., 2001; PENNA & RODE, 2000). Além dessas vantagens, esses animais são

melhores avaliados em relação às considerações éticas e econômicas (DAMMASCHKE et al., 2010).

Apesar da diferença de espessura em relação ao esmalte e dentina dos seres humanos e dos ratos (2,5 mm x 100 µm, respectivamente), estes apresentam a mesma proporção destas estruturas (CINTRA et al., 2013; DAMMASCHKE et al., 2010). Também possuem mesmas características anatômicas, histológicas, biológicas e fisiológicas que os dentes de humanos (DAMMASCHKE et al., 2010; SASAKI & KAWAMATA-KIDO, 1995). Ainda, as reações biológicas essenciais, bem como a cicatrização de feridas de molares de ratos, são comparáveis aos de outros mamíferos (DAMMASCHKE et al., 2010).

Em nossos estudos anteriores com molares de ratos (CINTRA et al., 2013, 2016, 2016a), em estudos realizados em cães (SEALE et al., 1981), estudos em humanos (MARSON et al., 2014; COSTA et al., 2010), assim como estudos realizados *in vitro* com cultura de células e câmaras pulpares artificiais (SOARES et al., 2015), é mostrado que o gel clareador causa danos ao tecido ou à células da polpa. Desse modo, buscamos soluções, através de medicamentos anti-inflamatórios, para que esses danos pudessem ser minimizados.

No presente estudo, o medicamento de escolha foi o Carvedilol, por ser descrita na literatura sua ação antioxidante e anti-inflamatória (ARAUJO JUNIOR et al., 2013), que poderia minimizar os efeitos do H₂O₂. Não há na literatura atual estudos que investigaram a relação entre a polpa e o Carvedilol após clareação dentária, sendo o presente estudo, o primeiro a realizar esta avaliação.

Dos resultados

No presente estudo, observamos tecido pulpar com maior organização nos grupos que receberam o gel clareador seguido do Carvedilol, comparados ao que não receberam o agente anti-inflamatório, aceitando a hipótese apresentada.

Pesquisas atuais a respeito da clareação dentária tem se preocupado em investigar e solucionar os efeitos indesejáveis decorrentes deste procedimento (CHARAKORN et al., 2009; MINOUX; SERFATY, 2008), como a posterior sensibilidade espontânea relatada pela maior parte dos pacientes que clareiam seus dentes (HAYWOOD et al., 1994). Estudos deixam claro que o H₂O₂ tem a capacidade de atingir o tecido pulpar, ocasionando danos a este tecido (CINTRA et

al., 2016a; SOARES et al., 2016; BENETTI et al., 2004), o que pode explicar a presença da sensibilidade (REIS et al., 2011; KIM, 1990). Caviedes-Bucheli et al. (2008) mostraram que o procedimento de clareação dentária pode aumentar a expressão de substância P, um neurotransmissor nociceptivo responsável pela modulação e sensação de dor, o que de certa forma poderia justificar a intenção da utilização de anti-inflamatórios após este procedimento.

O Carvedilol foi relatado na literatura por ter um grande poder antioxidante e anti-inflamatório (LI et al., 2006; AKBAS et al., 2005; YUAN et al., 2004). Os estudos mostraram sua ação anti-inflamatória, através da redução de citocinas pró-inflamatórias associada ao aumento das citocinas anti-inflamatórias (LI et al., 2006). Já sua ação antioxidante foi demonstrada através da identificação da glutathione, proteína com potencial antioxidante, após a utilização do Carvedilol durante peroxidação lipídica (KUMAR & DOGRA, 2009; KOWALSKI et al., 2008). Ainda, mostrou-se capaz de reduzir a diabetes em ratos, bem como as lesões ósseas associadas (GOTO et al., 2011). Todas essas características nos mostram que este produto pode ser capaz de reduzir o estresse oxidativo gerado pelo H₂O₂ do gel clareador.

No presente estudo, podemos constatar no grupo Cla, que recebeu apenas o agente clareador, intensa desorganização celular e áreas de necrose, o que corrobora com os estudos realizados anteriormente (CINTRA et al., 2016; Cintra et al. 2013). No entanto, ao utilizarmos o gel de Carvedilol imediatamente após o tratamento clareador (grupo Cla+Carv), observamos uma menor desorganização tecidual, e inflamação que, a partir do terço médio da polpa coronária, não foi diferente significativamente do grupo controle. Esses resultados nos mostram que, neste modelo experimental, o Carvedilol mostrou-se com capacidade de minimizar a inflamação causada pelo agente clareador.

Sabe-se que o esmalte dentário possui microporos ou microtrincas (BENETTI et al., 2004; KAWAMOTO; TSUJIMOTO, 2004), que podem permitir a penetração deste produto, de modo a agir no tecido pulpar. Além disso, o H₂O₂ é capaz de aumentar a porosidade do esmalte (KAWAMOTO; TSUJIMOTO, 2004), o que pode facilitar a penetração do Carvedilol após o procedimento clareador.

Aos 30 dias, observamos no presente estudo, que o tecido pulpar dos molares que receberam a aplicação do gel clareador, apresentou-se organizado, e

com ausência de inflamação. O mesmo foi observado em estudo anterior, onde mesmo após danos severos causados à polpa pelo procedimento clareador, o tecido pulpar foi capaz de recuperar sua homeostasia após este período (CINTRA et al., 2016). Este fato poderia explicar a diminuição da sensibilidade dentária relatada pelos pacientes após certo tempo do procedimento clareador.

No entanto, observa-se que grande parte da câmara pulpar foi ocupada por dentina terciária. Nota-se que, aos 30 dias, não houve diferença significativa entre a quantidade de dentina terciária presente nos grupos Cla e Cla+Carv, apesar deste ter apresentado tecido pulpar com menor alteração no período de 2 dias. Em estudo anterior, a dentina terciária foi presente mesmo em grupos que receberam o gel clareador por um período de tempo mínimo (5 minutos), apesar da inflamação encontrada ter sido leve, ou até mesmo ausente (Cintra et al. 2016). Este fato pode ser explicado por estudos que demonstraram que baixas doses de H₂O₂ são capazes de estimular as células a se proliferarem e executarem suas funções (DAVIES, 1999; BURDON et al., 1995).

Células da polpa dentária humana, expostas a 0,1–0,3ug/mL H₂O₂, foram capazes de se proliferarem três dias após o contato com este (SOARES et al., 2014). Baixas doses de H₂O₂ também induziram a diferenciação de células-tronco mesenquimais em odontoblastos (LEE et al., 2006). Acredita-se que em baixa concentração, o H₂O₂ atua como agente de sinalização para a mitose celular (DAVIES, 1999), e desempenha papel importante na transdução do sinal que modula o comportamento das células (WU et al., 2013; LIU et al., 2002; CHANG & KARIN, 2001; FORMAN & TORRES, 2001). Assim, o presente estudo indica que a redução da inflamação pelo uso do Carvedilol, no período de 2 dias, não foi capaz de influenciar a produção de dentina terciária observada aos 30 dias do procedimento clareador.

Em resumo, este estudo fornece informações pertinentes sobre patogênese da inflamação pulpar causada pelo procedimento clareador, que se mostrou controlada após a utilização de um anti-inflamatório, no caso o Carvedilol. Outros estudos devem ser realizados para se confirmar os dados encontrados no presente trabalho e dar continuidade ao entendimento do mecanismo de ação do H₂O₂, bem como de terapias que possam atuar na redução dos efeitos danosos sobre o tecido pulpar proveniente do procedimento clareador.

7. CONCLUSÃO

Concluiu-se que o gel de Carvedilol apresenta potencial de minimizar os danos do H_2O_2 presente no gel clareador ao tecido pulpar de ratos Wistar, especialmente em regiões mais profundas da polpa.

REFERÊNCIAS

1. Arab HH, El-Sawalhi MM (2013) Carvedilol alleviates adjuvant-induced arthritis and subcutaneous air pouch edema: modulation of oxidative stress and inflammatory mediators. *Toxicol Appl Pharmacol* 268: 241–248. doi: 10.1016/j.taap.2013.01.019 PMID: 23360886
2. Akbas H, Ozden M, Kanko M, Maral H, Bulbul S, Yavuz S, Ozker E, Berki T. Protective antioxidant effects of carvedilol in a rat model of ischaemia-reperfusion injury. *J Int Med Res*. 2005 Sep-Oct; 33(5): 528-36.
3. Araújo Júnior RF, Souza TO, de Medeiros CA, de Souza LB, Freitas Mde L, de Lucena HF, do Socorro Costa Feitosa Alves M, de Araújo AA. Carvedilol decrease IL-1 β and TNF- α , inhibits MMP-2, MMP-9, COX-2, and RANKL expression, and up-regulates OPG in a rat model of periodontitis. *PLoS One*. 2013 Jul 3;8(7):e66391.
4. Barghi N. Making a clinical decision for vital tooth bleaching: at-home or in-office? *Compend Contin Educ Dent*.1998; 19:831-8; quiz 840.
5. Benetti AR, Valera MC, Mancini MNG, Miranda CB & Balducci I. In vitro penetration of bleaching agents into the pulp chamber. *Int Endod J*. 2004; 37(2) 120.
6. Buchalla, W, Attin, T. External bleaching therapy with activation by heat, light or laser – a systematic review. *Dent Mater*. 2007; 23(5):586-96.
7. Burdon RH. Superoxide and hydrogen peroxide in relation to mammalian cell proliferation. *Free Radic Biol Med*. 1995 Apr; 18(4): 775-94. Review.
8. Camps J, De Franceschi H, Idir F, Roland C, About I: Time-course diffusion of hydrogen peroxide through human dentin: clinical significance for young tooth internal bleaching. *J Endod*. 2007; 33: 455–459.
9. Camps J, Pommel L, Aubut V, About I. Influence of acid etching on hydrogen peroxide diffusion through human dentin. *Am J Dent*. 2010 Jun; 23(3):168-70.
10. Carrasco-Guerisolild, Schiavoni RJ, Barroso JM, Guerisoli DM, Pécora JD, Fröneric. Effect of different bleaching systems on the ultrastructure of bovine dentin. *Dent Traumatol*. 2009 Apr; 25(2):176-80.

11. Caviedes-Buchelli J, Ariza-Garcia G, Restrepo-Méndez S, Rios-Osório N, Lombana N, Muñoz HR. The effect of tooth bleaching on substance P expression in human dental pulp. *J Endod* 2008; 34:1462-5.
12. Chang L, Karin M. Mammalian MAP kinase signaling cascades. *Nature* 2001;410: 37–40.
13. Charakorn P, Cabanilla LL, Wagner WC, Foong WC, Shaheen J, Pregitzer R, Schneider D. The effect of preoperative ibuprofen on tooth sensitivity caused by in-office bleaching. *Oper Dent*. 2009; 34(2):131-5.
14. Cintra LT, Benetti F, Ferreira LL, Gomes-Filho JE, Ervolino E, Gallinari Mde O, Rahal V, Briso AL. Penetration Capacity, Color Alteration and Biological Response of Two In-office Bleaching Protocols. *Braz Dent J*. 2016a Apr;27(2):169-75.
15. Cintra LT, Benetti F, Ferreira LL, Rahal V, Ervolino E, Jacinto Rde C, Gomes Filho JE, Briso AL. Evaluation of an experimental rat model for comparative studies of bleaching agents. *J Appl Oral Sci*. 2016 Jan-Feb; 24(1):95-104.
16. Cintra LTA, BENETTI F, Da Silva Facundo AC, Ferreira LL, Gomes-Filho JE, Ervolino E, Rahal V, Briso AL. The number of bleaching sessions influences pulp tissue damage in rat teeth. *J Endod* 2013 Dec; 39(12):1576-80.
17. Costa CAS, Riehl H, Kina JF, Sacono NT, Hebling J. Human pulp responses to the in-office tooth bleaching treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2010; 109:e59-64.
18. Dammaschke T. Rat molar teeth as a study model for direct pulp capping research in dentistry *Lab Anim*. 2010 Jan; 44(1):1-6.
19. Davies KJ. The broad spectrum of responses to oxidants in proliferating cells: a new paradigm for oxidative stress. *IUBMB Life*. 1999 Jul; 48(1): 41-7. Review.
20. De Araújo Júnior RF, Souza TO, De Medeiros CA, De Souza LB, Freitas MD e L, De Lucena HF, Do Socorro Costa Feitosa Alves M, De Araújo AA. Carvedilol decrease IL-1 β and TNF- α , inhibits MMP-2, MMP-9, COX-2, and RANKL expression, and up-regulates OPG in a rat model of periodontitis. *PLoS One*. 2013 Jul 3;8(7):e66391.

21. Dunn OJ. Estimation of the means of dependent variables. *Ann Math Statist* 1958; 29(4):1095-1111.
22. Eimar H, Siciliano R, Abdallah MN, et al. Hydrogen peroxide whitens teeth by oxidizing the organic structure. *J Dent* 2012; 40:e25–33.
23. Esposito P, Varvara G, Murmura G, Terlizzi A, Caputi S. Ability of healthy and inflamed human dental pulp to reduce hydrogen peroxide. *Eur J Oral Sci.* 2003; 111:454–6.
24. Fontes CER. Estudo do reparo do ferimento de colon de rato com o lado seroso da parede de jejuno, utilizando cianocrilato e cola de fibrina. 2001. 49f. Tese(doutorado em medicina) – Escola Paulista Medicina, 2001.
25. Forman HJ, Torres M. Redox signaling in macrophages. *Mol Aspects Med* 2001; 22: 189–216.
26. Goldstein, R.E. et al. Esthetic update: the changing esthetic dental practice. *J Am Dent Assoc.* 1994; 125:1447-56.
27. Goto S, Fujii H, Kono K, Nakai K, Hamada Y, Yamato H, Shinohara M, Kitazawa R, S Kitazawa, Nishi S, Fukagawa M. Carvedilol melhora a doença óssea de baixo volume de negócios em diabetes não-obesos do tipo 2. *Am J Nephrol* . 2011; 34 (3): 281-90.
28. Hamdy, N., El-Demerdash, E., 2012. New therapeutic aspect for carvedilol: antifibrotic effects of carvedilol in chronic carbon tetrachloride-induced liver damage. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 261, 292–299.
29. Hanks CT, Fat JC, Wataha JC, Corcoran JF. Cytotoxicity and dentin permeability of carbamide peroxide and hydrogen-peroxide vital bleaching materials, in vitro. *J Dent Res* 1993; 72:931–8.
30. Hannig C, Weinhold HC, Becker K, Attin T. Diffusion of peroxides through dentine in vitro with and without prior use of a desensitizing varnish. *Clin Oral Investig.* 2011 Dec; 15(6):863-8.
31. Haywood HB, Leonard RH, Nelson CF *et al.* Effectiveness, side effects and long-term status of nighthguard vital bleaching. *J Am Dent Assoc.*1994; 125(9):1219-26.
32. Haywood VB, Heymann HO. Nightguard vital bleaching. *Quintessence Int* 1989; 20(3):173-6.
33. Haywood VB. Treating sensitivity during tooth whitening. *Compend Contin*

- Educ Dent. 2005; 26(9):11-20.
34. Kawamoto K, Tsujimoto Y. Effects of the hydroxyl radical and hydrogen peroxide on tooth bleaching. *J Endod.*2004; 30:45-50.
 35. Kim S. Neurovascular interactions in the dental pulp in health and inflammation. *J Endod.* 1990; 16:48-53.
 36. Korytowski W, Sarna T. Bleaching of melain pigments. Role of copper ions and hydrogen peroxide in autooxidation and photoxidation of synthetic dopa-melanin. *J BiolChem.* 1990; 265:12410-6.
 37. Kowalski J, Banach M, Barylski M, Irzmanski R, Pawlicki L. Carvedilol modifies antioxidant status of patients with stable angina. *Cell Mol Biol Lett.* 2008; 13(2):230-9.
 38. Kumar, A., Dogra, S., 2009. Neuroprotective effect of carvedilol, an adrenergic antagonist against colchicine induced cognitive impairment and oxidative damage in rat. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 92, 25–31.
 39. Lee DH, Lim BS, Lee YK, Yang HC. Effects of hydrogen peroxide (H₂O₂) on alkaline phosphatase activity and matrix mineralization of odontoblast and osteoblast cell lines. *Cell Biology and Toxicology* 2006; 22(1):39-46.
 40. Li B, Liao YH, Cheng X, Ge H, Guo H, Wang M. Effects of carvedilol on cardiac cytokines expression and remodeling in rat with acute myocardial infarction. *Int J Cardiol.* 2006 Aug 10; 111(2): 247-55.
 41. Lillie RD. *Histopathologic technique and practical histochemistry.* New York, Blakinston, 2 ed, 501fls, 1954.
 42. Lima AF, Lessa FC, Mancini MN, Hebling J, Costa CA, Marchi GM. Transdental protective role of sodium ascorbate against the cytopathic effects of H₂O₂ released from bleaching agents. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2010 Apr;109(4):e70-6.
 43. Liu SL, Lin X, Shi DY, et al. Reactive oxygen species stimulated human hepatoma cell proliferation via cross-talk between PI3-K/PKB and JNK signaling pathways. *Arch BiochemBiophys* 2002;406:173–82.
 44. Markowitz. Pretty painful: Why does tooth bleaching hurt? *Medical Hypotheses.* 2010; 74:835-40.
 45. May LG, Salvia AC, Souza RO, Michida SM, Valera MC, Takahashi FE, Bottino MA. Effect of sodium ascorbate and the time lapse before

- cementation after internal bleaching on bond strength between dentin and ceramic. *J Prosthodont*. 2010 Jul; 19(5):374-80.
46. Minoux M, Serfaty R. Vital tooth bleaching: biologic adverse effects-a review. *Quintessence Int*. 2008; 39:645-59.
 47. Oliveira, P.J., Bjork, J.A., Santos, M.S., Leino, R.L., Froberg, M.K., Moreno, A.J., Wallace, K.B., 2004. Carvedilol-mediated antioxidant protection against doxorubicin-induced cardiac mitochondrial toxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol*. 200, 159–168.
 48. Penna LAP, Rode SM. Estudo morfológico da polpa de molares de ratos Wistar frente a uma oclusão traumática experimental. *PesqOdont Bras*. 2000 abr/jun;14(2):159-64.
 49. Reis A, Dalanhol AP, Cunha TS, Kossatz S, Loguercio AD. Assessment of tooth sensitivity using a desensitizer before light-activated bleaching. *Oper Dent*.2011;36:12-7.
 50. Sasaki RT, Flório FM, Basting RT. Effect of 10% sodium ascorbate and 10% alpha-tocopherol in different formulations on the shear bond strength of enamel and dentin submitted to a home-use bleaching treatment. *Oper Dent*. 2009 Nov-Dec; 34(6):746-52.
 51. Sasaki T, Kawamata-Kido H. Providing an environment for reparative dentine induction in amputated rat molar pulp by high molecular-weight hyaluronic acid. *Arch Oral Biol* 1995; 40:209–19.
 52. Seale NS, Mcintosh JE, Taylor AN. Pulpal reaction to bleaching of teeth in dogs. *J Dent Res*. 1981; 80:948-53.
 53. Siegel S. Non-parametric statistic for the behavioral sciences. McGraw-Hill Book Co., N.Y. 1956; 184-94.
 54. Singh D, Chander V, Chopra K. Carvedilol, an antihypertensive drug with antioxidant properties, protects against glycerol-induced acute renal failure. *Am J Nephrol*. 2003 Nov-Dec;23(6):415-21.
 55. Soares DG, Basso FG, Scheffel DS, Hebling J, de Souza Costa CA. Responses of human dental pulp cells after application of a low-concentration bleaching gel to enamel. *Arch Oral Biol*. 2015 Sep;60(9):1428-36.
 56. Soares DG, Basso FG, Hebling J, de Souza Costa CA. Concentrations of

and application protocols for hydrogen peroxide bleaching gels: effects on pulp cell viability and whitening efficacy. *J Dent.* 2014 Feb;42(2):185-98.

57. Vargas FDA S, Soares DG, Basso FG, Hebling J. Dose-response and time-course of α -tocopherol mediating the cytoprotection of dental pulp cells against hydrogen peroxide. *Braz Dent J.* 2014 Oct; 25(5):367-71.
58. Wu, T.T., Li, L.F., Du, R., Jiang, L., Zhu, Y.Q. (2013). Hydrogen peroxide induces apoptosis in human dental pulp cells via caspase-9 dependent pathway, *Journal of Endodontics*, 39, 1151-1155.
59. Yuan Z, Shioji K, Nimata M, Kishimoto C. Cardioprotective effects of carvedilol on acute autoimmune myocarditis. *Mol Cell Biochem.* 2004 Apr; 259(1-2): 223-7.
60. Zhu JN, Chen R, Fu YH, Lin QX, Huang S, Guo LL, Zhang MZ, Deng CY, Zou X, Zhong SL, Yang M, Zhuang J, Yu XY, Shan ZX. Smad3 inactivation and MiR-29b upregulation mediate the effect of carvedilol on attenuating the acute myocardium infarction-induced myocardial fibrosis in rat. *PLoS One.* 2013 Sep 25; 8(9): e75557.

ANEXOS

ANEXO A – Certificado da Aprovação da Comissão de Ética na Experimentação Animal



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"**



**CAMPUS ARAÇATUBA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA**

**CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA - Ethics Committee on the Use of Animals**

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado "**Avaliação dos efeitos antiinflamatórios, antioxidantes e remineralizantes de fármacos sobre o tecido pulpar de molares de ratos Wistar após clareação dentária. Um estudo in vivo**", Processo FOA nº 00631-2015, sob responsabilidade de Luciano Tavares Angelo Cintra apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 09 de Dezembro de 2015.

VALIDADE DESTE CERTIFICADO: 10 de Outubro de 2016.

DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 10 de Novembro de 2016.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled "**Evaluation of anti-inflammatory, antioxidant and remineralizing effects of drugs in the pulp tissue of Wistar rats molars following dental bleaching. In vivo study**", Protocol FOA nº 00631-2015, under the supervision of Luciano Tavares Angelo Cintra presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on December 09, 2015.

VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: October 10, 2016.

DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: November 10, 2016.

Profa. Adj. Maria Cristina Rosifini Alves Rezende
Vice-Coordenadora da CEUA
CEUA Vice-Coordinator

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba
Rua José Bonifácio, 1193 - Vila Mendonça - CEP: 16015-050 - ARAÇATUBA - SP
Fone (18) 3636-3234 Email CEUA: ceua@foa.unesp.br