



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

CAMPUS DE ARAÇATUBA

MARINA CARMINATTI

DISSERTAÇÃO

Avaliação *in vivo* e *in vitro* do Biosilicato® frente ao estresse oxidativo, penetração do peróxido de hidrogênio e eficácia clareadora.

ARAÇATUBA-SP

2019



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

CAMPUS DE ARAÇATUBA

MARINA CARMINATTI

Avaliação *in vivo* e *in vitro* do Biosilicato® frente ao estresse oxidativo, penetração do peróxido de hidrogênio e eficácia clareadora.

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Araçatuba, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como parte dos requisitos para a obtenção do título de mestre em Endodontia.

Orientador: Prof. Dr. Luciano Tavares Angelo
Cintra

Coorientador: Prof. Dr. André Luiz Fraga Briso

ARAÇATUBA-SP

2019

Catálogo-na-Publicação (CIP)

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

C287a	Carminatti, Marina. Avaliação in vivo e in vitro do Biosilicato® frente ao estresse oxidativo, penetração do peróxido de hidrogênio e eficácia clareadora / Marina Carminatti. -- Araçatuba, 2019. 99 f. : il.; tab. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia de Araçatuba Orientador: Prof. Luciano Tavares Angelo Cintra Coorientador: Prof. André Luiz Fraga Briso 1. Clareamento dental 2. Peróxido de hidrogênio 3. Pulpite I. Título Black D24 CDD 617.6
-------	---

Ana Claudia M. Grieger Manzatti – CRB-8/6315

ERRATA

CARMINATTI, M. **Avaliação *in vivo* e *in vitro* do Biosilicato® frente ao estresse oxidativo, penetração do peróxido de hidrogênio e eficácia clareadora.** 2019. 99 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2019.

FOLHA	LINHA	ONDE SE LÊ	LEIA-SE
5	10	À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pela concessão da bolsa de mestrado e pelo apoio financeiro para a realização da pesquisa.	À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pela concessão da bolsa de mestrado e pelo apoio financeiro para a realização da pesquisa Processo nº 2016/23362-3, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP). À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) pelo apoio na realização do presente trabalho - Código de Financiamento 001.

Dedico esta e todas as minhas vitórias já alcançadas aos meus pais, Maria e Vanderlei, por estarem sempre ao meu lado na luta pelos meus sonhos e não me permitirem desistir.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, grande criador do Universo, por essa e todas as graças já alcançadas.

A minha família, pelo apoio e amor incondicional dado a mim por todos esses anos.

Ao meu namorado, por ser meu amigo e incentivador, por viver ao meu lado proporcionando amor, paz e felicidade.

Ao meu orientador, por me permitir realizar este sonho e por todos os ensinamentos que guardarei por toda minha vida.

Ao meu coorientador pela atenção, paciência e ensino.

A todos os professores da universidade que tive a chance de conviver e aprender

A todos os meus amigos que estiveram ao meu lado nesta etapa dividindo conhecimentos e momentos felizes.

Aos funcionários da universidade por todo apoio e dedicação.

A Universidade Estadual Paulista pela oportunidade de realizar mais esta etapa.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pela concessão da bolsa de mestrado e pelo apoio financeiro para a realização da pesquisa.

E a todos que direta ou indiretamente fizeram parte deste trabalho, muito obrigada.

“Tudo que está no plano da realidade já foi sonho um dia.”

Leonardo da Vinci

CARMINATTI, M. **Avaliação *in vivo* e *in vitro* do Biosilicato® frente ao estresse oxidativo, penetração do peróxido de hidrogênio e eficácia clareadora.** 2019. 99 f. Dissertação (Mestre em Endodontia) - Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2019.

RESUMO

Novos produtos estão sendo desenvolvidos com o propósito de atenuar os efeitos dos compostos utilizados em procedimentos clareadores. O objetivo do presente estudo foi avaliar *in vivo* o potencial terapêutico do gel de Biosilicato® (BS) sobre o tecido pulpar de molares de ratos Wistar, por meio das análises histológica e imunoistoquímica, assim como analisar *in vitro*, a penetração do H₂O₂ e a eficácia clareadora em dentes bovinos. Para isso, este estudo foi dividido em 2 partes. Parte 1: Segmento *in vivo*: 50 hemi-maxilas de 25 ratos foram divididas aleatoriamente em 5 grupos (n=10): Controle- não recebeu qualquer tratamento; CLA- recebeu 30 min do gel clareador H₂O₂ 35%; BS-CLA- recebeu 20 min do gel de BS, seguido de 30 min do H₂O₂ 35%; CLA+BS- recebeu 30 min de uma mistura do H₂O₂ 35% com o gel BS (1:1); CLA+H₂O- recebeu 30 min de uma mistura do H₂O₂ 35% com água destilada (1:1). Após 2 dias, os animais foram mortos e as hemi-maxilas separadas para análise histológica em H.E. Foram atribuídos escores à inflamação e os dados submetidos aos testes de Kruskal-Wallis e Dunn e teste de Mann-Whitney (p<0,05). Segmento *in vitro*: 50 discos de dentes bovinos foram acoplados em câmaras pulpares artificiais, e divididos em 5 grupos (n=10) que receberam os mesmos tratamentos que o segmento *in vivo*. A penetração do H₂O₂ por esmalte e dentina foi quantificada baseada na reação deste com o corante violeta leucocristal. A alteração de cor foi analisada pelo sistema CIELab, nos períodos: antes da sessão clareadora – (T0), imediatamente após (T1), e 24 horas após (T2), e os dados submetidos à análise de variância (ANOVA) seguida do teste Tukey (p<0,05). Parte 2: 40 hemi-maxilas de 20 ratos foram divididas aleatoriamente em 4 grupos (n=10): Controle, CLA, BS-CLA e CLA+BS. Após 2 dias, os animais foram mortos e as hemi-maxilas separadas para análise histológica em H.E. e imunoistoquímica para PCNA, HO-1, TNF-α e Substância P.

Foram atribuídos escores à inflamação e à imunomarcação de TNF- α , e submetidos aos testes de Kruskal-Wallis e Dunn ($p < 0,05$). Para análise da área correspondente à imunomarcação obtida através da densidade óptica de imunomarcação da Substância P foi realizada a análise da variância (ANOVA) seguida do teste de Tukey para comparação entre as médias. Foram realizadas as contagens das células imunomarcadas para HO-1 e PCNA, e foram submetidas ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk para definir o teste estatístico ($p < 0,05$). Na análise histológica, o grupo CLA apresentou predominantemente necrose no terço oclusal e médio da polpa coronária, enquanto o BS-CLA apresentou inflamação severa no terço oclusal e moderada no terço médio, ambos diferentes do Controle ($p < 0,05$). O grupo CLA+BS apresentou inflamação moderada no terço oclusal, sem diferença para o grupo BS-CLA ($p > 0,05$), inflamação leve no terço médio, e ausência de inflamação no terço cervical sem diferença para o Controle ($p > 0,05$). O grupo CLA+ H₂O apresentou inflamação leve no terço oclusal e ausente nos demais terços, sem diferença para o grupo CLA+BS e Controle ($p > 0,05$). No terço cervical, o grupo CLA apresentou inflamação moderada, diferente do grupo Controle ($p < 0,05$). Os grupos CLA e BS-CLA, apresentaram maior penetração de H₂O₂ ($p < 0,05$). Na alteração de cor imediata e após 24 horas, os grupos CLA, BS-CLA e CLA+BS, apresentaram alteração de cor semelhante ($p > 0,05$). Conclusão: O Biosilicato® é capaz de reduzir o processo inflamatório causado pelo gel clareador e auxilia no processo de reparo. O protocolo de aplicação do BS misturado com o gel clareador apresentou melhores resultados, uma vez que reduz a penetração do gel clareador e mantém a eficácia clareadora.

Palavras Chave: Clareamento Dental. Peróxido de Hidrogênio. Pulpite.

CARMINATTI, M. *In vivo* and *in vitro* evaluation of Biosilicate® against oxidative stress, hydrogen peroxide penetration and bleaching efficacy. 2019. 99 f. Dissertação (Mestre em Endodontia) - Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2019.

ABSTRACT

New products are being developed with the purpose of mitigating the effects of the compounds used in bleaching procedures. The objective of the present study was to evaluate *in vivo* the therapeutic potential of Biosilicate® (BS) gel on the pulp tissue of Wistar rats by means of histological and immunohistochemical analysis, as well as to analyze *in vitro*, the penetration of H₂O₂ and bleaching efficiency in bovine teeth. For this, this study was divided into 2 parts. Part 1: *In vivo* segment: 50 hemi-maxilla of 25 rats were randomly divided into 5 groups (n = 10): Control- received no treatment; CLA- received 30 min of the 35% H₂O₂ bleaching gel; BS-CLA- received 20 min of BS gel, followed by 30 min of 35% H₂O₂; CLA+BS- received 30 min of a mixture of 35% H₂O₂ with the BS gel (1:1); CLA+H₂O- received 30 min of a mixture of 35% H₂O₂ with distilled water (1:1). After 2 days, the animals were killed and the hemi-maxils separated for histological analysis in H.E. Inflammation scores and data submitted to the Kruskal-Wallis and Dunn tests and Mann-Whitney test (p<0.05) were assigned. Segment *in vitro*: 50 discs of bovine teeth were coupled in artificial pulp chambers, and divided into 5 groups (n=10) that received the same treatments as the *in vivo* segment. The penetration of H₂O₂ by enamel and dentin was quantified based on the reaction of this with the leucocrystal violet dye. The color change was analyzed by the CIELab system, in the periods: before the bleaching session - (T0), immediately after (T1), and 24 hours after (T2), and data submitted to analysis of variance (ANOVA) followed by the test Tukey (p<0.05). Part 2: 40 hemi-maxillae of 20 rats were randomly divided into 4 groups (n=10): Control- received no treatment; CLA- received 30 min of the 35% H₂O₂ bleaching gel; BS-CLA- received 20 min of BS gel, followed by 30 min of 35% H₂O₂; CLA+BS- received 30 min of a mixture of 35%

H₂O₂ with the BS gel (1:1). After 2 days, the animals were killed and the hemi-maxilla separated for histological analysis in HE and immunohistochemistry for PCNA, HO-1, TNF- α and P-Substance. Scores were assigned to TNF- α inflammation and immunostaining, and submitted to the Kruskal-Wallis and Dunn tests ($p < 0.05$). For the analysis of the area corresponding to the immunostaining obtained through the optical density of the Substance P, an analysis of the variance (ANOVA) was performed, followed by the Tukey test for comparison between the means. We counted the immunolabelled cells for HO-1 and PCNA and were submitted to the Shapiro-Wilk normality test to define the statistical test ($p < 0.05$). In the histological analysis, the CLA group presented predominantly necrosis in the occlusal and middle third of the coronary pulp, whereas the BS-CLA presented severe inflammation in the occlusal third and moderate in the middle third, both different from the Control ($p < 0.05$). The CLA+BS group presented moderate inflammation in the occlusal third, with no difference for the BS-CLA group ($p > 0.05$), slight inflammation in the middle third, and absence of inflammation in the cervical third without difference for Control ($p > 0.05$). The CLA+H₂O group had mild inflammation in the occlusal third and absent in the remaining thirds, with no difference for CLA+BS and Control group ($p > 0.05$). In the cervical third, the CLA group had moderate inflammation, different from the Control group ($p < 0.05$). The CLA and BS-CLA groups presented higher penetration of H₂O₂ ($p < 0.05$). At the immediate color change and after 24 hours, the CLA, BS-CLA and CLA+BS groups presented similar color changes ($p > 0.05$). Conclusion: Given the results obtained in both studies, it can be concluded that Biosilicate® is able to reduce the inflammatory process caused by the bleaching gel and helps in the repair process. The application protocol of BS blended with the bleaching gel showed better results as it reduces the penetration of the bleaching gel and maintains bleaching efficacy.

Key words: Tooth Bleaching. Hydrogen Peroxide. Pulpitis.

LISTA DE FIGURAS (CAPÍTULO 1)

Páginas

Figura 1 -	Fotomicrografia representativa dos espécimes dos grupos após 2 dias	38
------------	---	-----------

LISTA DE TABELAS (CAPÍTULO 1)

Páginas

Tabela 1 -	Distribuição dos grupos experimentais de acordo com o tratamento realizado	28
------------	--	-----------

Tabela 2 -	Escore atribuídos para a resposta inflamatória	31
------------	--	-----------

Tabela 3 -	Escore atribuídos para o infiltrado inflamatório após 2 dias	39
------------	--	-----------

Tabela 4 -	Quantificação da penetração do H ₂ O ₂ em cada grupo avaliado	40
------------	---	-----------

Tabela 5 -	Quantificação da alteração de cor de cada grupo em diferentes períodos de análise.	42
------------	--	-----------

LISTA DE FIGURAS (CAPÍTULO 2)

Páginas

Figura 1 -	Fotomicrografias representativas dos espécimes dos grupos após 2 dias	72
Figura 2 -	Fotomicrografias representativas dos espécimes dos grupos com imunomarcação para TNF-alfa.	74
Figura 3 -	Fotomicrografias representativas dos espécimes dos grupos com imunomarcação para Substância P.	77
Figura 4 -	Fotomicrografias representativas dos espécimes dos grupos com imunomarcação para PCNA.	80
Figura 5 -	Fotomicrografias representativas dos espécimes dos grupos com imunomarcação para HO-1.	83

LISTA DE TABELAS (CAPÍTULO 2)

Páginas

Tabela 1 - Distribuição dos grupos experimentais de acordo com o tratamento realizado	65
---	----

Tabela 2 - Escores atribuídos para a resposta inflamatória	69
--	----

Tabela 3 - Escores atribuídos para o padrão de imunomarcção para TNF-alfa	70
---	----

Tabela 4 - Escores atribuídos para o infiltrado inflamatório e imunomarcção para TNF-alfa	75
---	----

Tabela 5 - Densidade óptica de imunomarcção para Substância P	78
---	----

Tabela 6 - Contagem de células imunomarcadas para PCNA por mm ²	81
--	----

Tabela 7 - Contagem de células imunomarcadas para HO-1 por mm ²	84
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS

H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
BS	Biosilicato®
H.E	Hematoxilina e Eosina
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral Alfa
HO-1	Heme-oxigenase 1
PCNA	Antígeno Nuclear de Proliferação Celular
CPA	Câmara Pulpar Artificial
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
DAB	Tetracloridrato de Diaminobenzidina
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetra-acético
HRP	Peroxidase da Raiz Forte

PBS		Tampão Fosfato Salino
PBS-TX	100	Tampão Fosfato Salino acrescido de 0,1% de Triton X-
H ₂ O		Água

SUMÁRIO

Páginas

1	INTRODUÇÃO GERAL.....	18
2	CAPÍTULO 1 - Biosilicato® minimiza danos causados pelo gel clareador no tecido pulpar, reduzindo a penetração trans-amelodentinária do H ₂ O ₂ sem alterar a eficácia clareadora	19
2.1	Resumo.....	20
2.2	Abstract.....	22
2.3	Introdução.....	24
2.4	Objetivo.....	26
2.5	Materiais e Métodos.....	27
2.6	Resultados.....	36
2.7	Discussão.....	44

2.8	Conclusão.....	47
2.9	Referências.....	48
3	CAPÍTULO 2 - Efeito terapêutico do Biosilicato® frente ao estresse oxidativo pulpar e sensibilidade dentária decorrente do procedimento clareador.	56
3.1	Resumo.....	57
3.2	Abstract.....	59
3.3	Introdução.....	61
3.4	Objetivo.....	63
3.5	Materiais e Métodos.....	64
3.6	Resultados.....	71
3.7	Discussão.....	87

3.8	Conclusão.....	91
3.9	Referências.....	92
	ANEXO (Certificado do Comitê de Ética no uso de animais)	99

1 INTRODUÇÃO GERAL

Em um estudo piloto sobre a associação do Biosilicato® com a clareação dentária, com o intuito de verificar sua ação sobre o tecido pulpar de molares de ratos Wistar clareados através de diversos protocolos de aplicação adaptados de estudos já relatados na literatura, observamos que após o período de dois dias, o grupo que recebeu apenas o gel clareador (CLA) apresentou inflamação grave e necrose no terço oclusal da polpa coronária. Já o grupo que recebeu aplicação prévia do BS (BS-CLA) e o grupo que teve o BS misturado ao agente clareador (CLA+BS) demonstrou inflamação moderada, sendo este último semelhante ao grupo controle ($p > 0,05$). Com esse estudo, podemos concluir que a aplicação prévia do BS ao gel clareador ou misturado a ele, poderia minimizar o dano causado à polpa dentária de ratos Wistar pós-clareação (processo FAPESP nº 2015/22996-6).

A partir deste estudo surgiram dúvidas relacionadas com o mecanismo de ação do BS que poderiam ser solucionadas através de um estudo *in vivo* realizado em molares de ratos Wistar por meio da análise histológica em H.E e da marcação imunoistoquímica para os marcadores PCNA, HO-1, TNF- α e Substância P e de uma investigação *in vitro* em blocos de dentes bovinos a fim de avaliar penetração trans-amelodentinária do H_2O_2 e sua eficácia clareadora em função do uso do Biosilicato® antes ou misturado ao gel clareador.

A hipótese final é que o Biosilicato® é capaz de atuar durante o procedimento clareador como um anti-inflamatório e dessensibilizante, sendo capaz de reduzir o processo inflamatório e a penetração do peróxido de hidrogênio mantendo a eficácia clareadora, e auxiliando no processo de reparo.

2 CAPÍTULO 1 -

Biosilicato® minimiza danos causados pelo gel clareador no tecido pulpar, reduzindo a penetração trans-amelodentinária do H₂O₂ sem alterar a eficácia clareadora

2.1 RESUMO

Este estudo teve como objetivo investigar *in vivo* o potencial terapêutico do Biosilicato® (BS) em diferentes protocolos de aplicação, sobre o tecido pulpar de molares de ratos Wistar clareados e avaliar *in vitro* a penetração trans-amelodentinária do H₂O₂ a 35% e a eficácia clareadora em blocos de dentes bovinos. Segmento *in vivo*: 25 ratos tiveram suas hemi-maxilas divididas aleatoriamente em 5 grupos (n=10): Controle- não recebeu qualquer tratamento; CLA- recebeu 30 min do gel clareador H₂O₂ 35%; BS-CLA- recebeu 20 min do gel de BS, seguido de 30 min do H₂O₂ 35%; CLA+BS- recebeu 30 min de uma mistura do H₂O₂ 35% com o gel BS (1:1); CLA+H₂O recebeu 30 min de uma mistura do H₂O₂ 35% com água (1:1). Após 2 dias, os animais foram mortos e as hemi-maxilas separadas para análise histológica em H.E. Foram atribuídos escores à inflamação e os dados submetidos aos testes de Kruskal-Wallis e Dunn e teste de Mann-Whitney (p<0,05). Segmento *in vitro*: 50 discos de dentes bovinos foram acoplados em câmaras pulpares artificiais, e divididos em 5 grupos (n=10) que receberam os mesmos tratamentos do segmento *in vivo*. A penetração do H₂O₂ por esmalte e dentina foi quantificada baseada na reação deste com o corante violeta leucocristal. A alteração de cor foi analisada pelo sistema CIELab, nos períodos: antes da sessão clareadora – (T0), imediatamente após (T1), e 24 horas após (T2) e os dados submetidos à análise de variância (ANOVA) seguida do teste Tukey (p<0,05). Na análise histológica, o grupo CLA apresentou predominantemente necrose no terço oclusal e médio da polpa coronária, enquanto o BS-CLA apresentou inflamação severa no terço oclusal e moderada no terço médio, ambos diferentes do Controle (p<0,05). O grupo CLA+BS apresentou inflamação moderada no terço oclusal, sem diferença para o grupo BS-CLA (p>0,05), inflamação leve no terço médio, e ausência de inflamação no terço cervical sem diferença para o Controle (p>0,05). O grupo CLA+H₂O apresentou inflamação leve no terço oclusal e ausente nos demais terços, sem diferença para o grupo CLA+BS e Controle (p>0,05). No terço cervical, o grupo CLA apresentou inflamação moderada, diferente do grupo Controle (p<0,05). Na análise de penetração do H₂O₂, os grupos CLA e BS-CLA, apresentaram maior penetração, diferentes do grupo controle (p<0,05), enquanto os grupos CLA+BS e CLA+H₂O apresentaram menor penetração quando comparados ao grupo CLA.

($p < 0,05$). Na alteração de cor imediata e após 24 horas, os grupos CLA, BS-CLA e CLA+BS, apresentaram alteração de cor semelhante ($p > 0,05$), sendo diferentes do grupo controle ($p < 0,05$). Conclusão: O BS aplicado antes do gel clareador ou na mistura é capaz de minimizar o processo inflamatório causado pela clareação dentária. Além disso, o BS misturado ao gel clareador reduziu a penetração do H_2O_2 e manteve a eficácia clareadora.

Palavras Chave: Clareamento Dental. Peróxido de Hidrogênio. Pulpite.

2.2 ABSTRACT

This study aimed to investigate *in vivo* the therapeutic potential of Biosilicate® (BS) in different application protocols on the pulp tissue of whitened Wistar rats and to evaluate *in vitro* the trans-amelodentinase penetration of 35% H₂O₂ and the efficacy bleaching machine in bovine tooth blocks. Segment *in vivo*: 25 rats had their hemi-maxillae randomly divided into 5 groups (n = 10): Control- received no treatment; CLA- received 30 min of the 35% H₂O₂ bleaching gel; BS-CLA- received 20 min of BS gel, followed by 30 min of 35% H₂O₂; CLA+BS- received 30 min of a mixture of 35% H₂O₂ with the BS gel (1: 1); CLA+H₂O received 30 min of a mixture of 35% H₂O₂ with water (1: 1). After 2 days, the animals were killed and the hemi-maxils separated for histological analysis in H.E. Inflammation scores and data submitted to the Kruskal-Wallis and Dunn tests and Mann-Whitney test (p<0.05) were assigned. Segment *in vitro*: 50 discs of bovine teeth were coupled in artificial pulp chambers, and divided into 5 groups (n = 10) that received the same treatments of the *in vivo* segment. The penetration of H₂O₂ by enamel and dentin was quantified based on the reaction of this with the leucocrystal violet dye. The color change was analyzed by the CIELab system, in the periods: before the bleaching session - (T0), immediately after (T1), and 24 hours after (T2) and the data submitted to analysis of variance (ANOVA) followed by the Tukey test (p<0.05). In the histological analysis, the CLA group presented predominantly necrosis in the occlusal and middle third of the coronary pulp, whereas the BS-CLA presented severe inflammation in the occlusal third and moderate in the middle third, both different from the Control (p<0.05). The CLA+BS group presented moderate inflammation in the occlusal third, with no difference for the BS-CLA group (p>0.05), slight inflammation in the middle third, and absence of inflammation in the cervical third without difference for Control (p>0.05). The CLA+H₂O group had mild inflammation in the occlusal third and absent in the remaining thirds, with no difference for CLA+BS and Control group (p>0.05). In the cervical third, the CLA group had moderate inflammation, different from the Control group (p<0.05). In the H₂O₂ penetration analysis, the CLA and BS-CLA groups presented higher penetration, different from the control group (p<0.05), whereas the CLA+BS and CLA+H₂O groups presented lower penetration when compared to the CLA group (p<0.05). In the immediate color change and after 24

hours, the CLA, BS-CLA and CLA+BS groups presented similar color changes ($p>0.05$), being different from the control group ($p<0.05$). Conclusion: BS applied before the bleaching gel or in the blend is able to minimize the inflammatory process caused by tooth whitening. In addition, BS® mixed with the bleaching gel reduced H_2O_2 penetration and maintained bleaching efficacy.

Key words: Tooth Bleaching. Hydrogen Peroxide. Pulpitis.

2.3 INTRODUÇÃO

A clareação dentária atrai cada vez mais olhares de pacientes insatisfeitos com a aparência de seu sorriso. Este procedimento é considerado ainda o método mais conservador e eficaz para obtenção de uma estética dentária agradável (DAHL & PALLESEN 2003, SAMORODNITZKY-NAVEH *et al.*, 2007).

Entretanto, foi visto através de alguns estudos realizados em molares de ratos que a aplicação do gel clareador pode gerar danos sobre a estrutura dentária (CINTRA *et al.*, 2013; 2016). Esses danos se devem ao principal componente dos géis clareadores, o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que ao entrar em contato com a estrutura dentária, se dissocia em espécies reativas de oxigênio que difundem-se por esmalte e dentina alcançando a polpa dentária e danificando esses tecidos (BENETTI *et al.*, 2004, CAMPS *et al.*, 2007, CAMPS *et al.*, 2010, HANNIG *et al.*, 2011, MARSON *et al.*, 2015, CINTRA *et al.*, 2016a).

A ação destes radicais livres pode induzir efeitos adversos no conteúdo mineral e matéria orgânica do esmalte dentário (ROTSTEIN *et al.*, 1996, HEGEDÜS *et al.*, 1999, JIANG *et al.*, 2008) causando alterações na morfologia de sua superfície (TÜRKÜN *et al.*, 2002, EFEOGLU *et al.*, 2007), como redução na microdureza, aumento da rugosidade e um certo grau de erosão (XU *et al.*, 2011). Na estrutura dentinária, também foram encontradas alterações na dureza e no conteúdo de cálcio e fósforo (ENGLE *et al.*, 2010), o que nos permite confirmar o alto poder de penetração das espécies reativas de oxigênio, principalmente após o aumento da permeabilidade dos tecidos mineralizados causado pelo H_2O_2 (BENETTI *et al.*, 2004, MENA-SERRANO *et al.*, 2015).

Assim, a busca por produtos que possam inibir a penetração do H_2O_2 no complexo dentino-pulpar, por meio do fortalecimento das estruturas mineralizadas, atuando como remineralizante e protetor destas estruturas, tem sido constante (CHEN *et al.*, 2008, DA COSTA SOARES *et al.*, 2013, BORGES *et al.*, 2014).

O vidro bioativo tem se destacado por possuir a propriedade de reconstituir a concentração de cálcio e fosfato (GJORGIEVSKA & NICHOLSON 2011) e precipitar a apatita, sendo capaz de ocluir túbulos dentinários, inibir a desmineralização, e promover remineralização do esmalte e dentina

(VOLLENWEIDER *et al.*, 2007, CURTIS *et al.*, 2010). Quando aplicado antes, após, e durante a clareação dentária, mostrou resultados satisfatórios como remineralizante e protetor das estruturas dentárias, sem prejudicar a eficácia do procedimento clareador (DENG *et al.*, 2013).

Por ser um produto desenvolvido a base de vitrocerâmica bioativa, o Biosilicato® mostrou-se como um agente remineralizante com excelentes propriedades bioativas (RENNO *et al.*, 2013, CHINELATTI *et al.*, 2017). A partir de um estudo anterior com o BS em diferentes protocolos de aplicação sobre molares de Ratos clareados onde foi possível concluir que a aplicação prévia do BS ou misturado ao gel clareador poderia minimizar o dano causado à polpa dentária pós-clareação (CARMINATTI *et al.*, 2017), surgiram algumas dúvidas frente aos benefícios do uso do BS associado à clareação dentária. Assim, a proposta deste estudo foi avaliar a penetração do H₂O₂ pelo complexo dentino-pulpar, a possível interferência do Biosilicato® na eficácia clareadora e sua ação junto ao tecido pulpar após a clareação dentária em diferentes protocolos de aplicação.

2.4 OBJETIVO

Investigar *in vivo* o potencial terapêutico do Biosilicato® em diferentes protocolos de aplicação sobre o tecido pulpar de molares de ratos Wistar clareados, por meio da análise histológica em H.E.

Investigar *in vitro*, após o procedimento clareador, a penetração trans-amelodentinária do H₂O₂ a 35% e a eficácia clareadora em blocos de dentes bovinos em função do uso do Biosilicato®.

2.5 MATERIAIS E MÉTODOS

Experimento *in vivo*

- Animais

Foram utilizados 25 ratos machos (*Rattus norvegicus 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 realizados neste estudo foram aprovados no comitê de ética local (Processo FOA nº 00229-2017).

- Drogas empregadas

Para anestesia dos animais foi utilizado via intramuscular um sedativo à base de Cloridrato de xilazina 2% (Xilazin, Syntec do Brasil LTDA – Cotia, São Paulo, Brasil) na dosagem de 10mg por quilograma de peso corporal, e um anestésico à base de Cloridrato de Cetamina a 10% (Ketamina Agener, União Química Farmacêutica Nacional S/A – Embu-Guaçu, São Paulo, Brasil) na dosagem de 80 mg por quilograma de peso corporal. Para eutanásia, foi utilizado um anestésico via intraperitoneal à base de tiopental sódico (Thiopentax, Cristália – Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda – Itapira, Brasil) na dosagem de 150mg por quilograma de peso corporal.

- Agente Clareador

Foi utilizado o produto clareador disponível no mercado, à base de peróxido de hidrogênio a 35%, Whiteness HP Maxx (FGM Produtos Odontológicos). 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 remineralizante

Foi utilizado um gel experimental à base de Biosilicato®, produzido a partir do pó de BS diluído em água destilada na proporção (1:10), desenvolvido e cedido pelo Laboratório de Materiais Vítreos, da Universidade Federal de São Carlos (TIRAPELLI *et al.*, 2010, TIRAPELLI *et al.*, 2011, PINTADO-PALOMINO *et al.*, 2015).

- 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	Procedimento pré-clareação	Clareação dentária
Controle	-	-
CLA	-	1 aplicação de 30 minutos do gel clareador
BS-CLA	30 segundos de fricção + 20 minutos de permanência do gel de BS	1 aplicação de 30 minutos do gel clareador
CLA+BS	-	1 aplicação de 30 minutos do gel clareador misturado com o gel de BS (1:1)
CLA+H ₂ O	-	1 aplicação de 30 minutos do gel clareador misturado com água (1:1)

- Sessão clareadora

Todos os animais foram anestesiados via intramuscular com uma associação do sedativo à base de Xilazina 2% (10mg/Kg) e o anestésico à base de cloridrato de Ketamina 10% (80 mg/Kg).

Distribuídos de forma aleatória, os molares de cada lado receberam os tratamentos como se segue:

- Grupo Controle: não recebeu qualquer produto;
- Grupo CLA: foi realizada a aplicação e fotoativação da barreira gengival resinosa (Top Dam – FGM Produtos Odontológicos), e em seguida, foi aplicado aproximadamente 0,01 mL de H₂O₂ 35% (KRAIGHER *et al.*, 2006, CINTRA *et al.*, 2013), que permaneceu em contato com o esmalte por 30 minutos (CINTRA *et al.*, 2016b);
- Grupo BS-CLA: foi realizada a aplicação do BS friccionado com microbrush sobre a superfície do esmalte por 30 segundos, e repousou por 20 minutos (adaptado de TIRAPELLI *et al.*, 2011 e DENG *et al.*, 2013). Em seguida foi realizado o procedimento clareador como no grupo CLA;
- Grupo CLA+BS: foram aplicados 0,01 mL da mistura do gel clareador com o gel de BS, na proporção de 1:1, que permaneceu em contato com o esmalte por 30 minutos (adaptado de DENG *et al.*, 2013).
- Grupo CLA+H₂O: foram aplicados 0,01 mL da mistura do gel clareador com a água destilada, na proporção de 1:1, que permaneceu em contato com o esmalte por 30 minutos.

Após cada tratamento realizado, a superfície do dente foi limpa com algodão e papel absorvente e lavada abundantemente com água, e a barreira gengival retirada.

- Eutanásia e processamento laboratorial

Decorrido o período pré-determinado de 2 dias após o procedimento clareador (KINA *et al.*, 2010, COSTA *et al.*, 2010, CINTRA *et al.*, 2013), os animais foram mortos com 150mg/Kg de Tiopental sódico. 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 e esquerdo, possibilitando a obtenção das hemimaxilas direita e esquerda.

As hemimaxilas foram colocadas imediatamente em frascos individuais devidamente identificados, contendo solução formalina a 10%, tamponada com pH neutro, durante as primeiras 20 horas e depois lavadas em água corrente por um período de 12 horas. Após a fixação, as peças foram desmineralizadas em solução de EDTA 10%.

As hemimaxilas foram então lavadas em água corrente, desidratadas em álcool, diafanizadas em xilol e incluídas em parafina. A orientação no momento da inclusão permite a realização de cortes teciduais dos molares superiores e estruturas de suporte em seu sentido longitudinal. Após inclusão, as peças foram cortadas com cortes semi-seriados, com 5 µm de espessura, realizados em micrótomo (Leica - RM 2045). Para fins de padronização, foi selecionada a raiz mesial do primeiro molar superior em cortes que proporcionaram a visualização desta raiz em seu sentido longitudinal pleno. Esta raiz serviu de orientação durante a realização dos cortes, e foram selecionados os cortes centrais da câmara pulpar. Para cada espécime, 02 lâminas com 3 cortes teciduais da polpa dentária cada, foram preparadas e coradas com Hematoxilina e Eosina.

- Análise dos resultados para a coloração de H.E.

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

Análise Qualitativa: A análise qualitativa dos cortes teciduais corados por H.E. foi realizada por meio da atribuição de escores. Esta análise consistiu na avaliação das condições histopatológicas das estruturas examinadas, em itens distintos, atribuindo magnitudes registradas sob a forma de escores de 1 a 5 para

resposta inflamatória (BENETTI *et al.*, 2017) (Tabela 2), possibilitando dados para uma análise estatística, por meio do Software SigmaPlot 12.0 (Chicago, IL, USA).

A intensidade do processo inflamatório foi analisada em conformidade com o número médio aproximado de células inflamatórias presentes em diferentes campos, de um mesmo espécime, examinados em aumento de 400X.

Tabela 2. Escores atribuídos para a resposta inflamatória.

Escore	Descrição
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 das lâminas coradas em H.E. foi efetuada por um observador cego calibrado que determinou os escores para cada espécime. Os resultados de cada grupo experimental foram apresentados por meio de uma análise comparativa.

De posse dos dados obtidos na forma de escores foi realizado o teste de Kruskal-Wallis e quando observada alguma diferença significativa, foi realizado o cruzamento entre os grupos, pelo teste de comparações múltiplas de Dunn. Também foi empregado o teste de Mann Whitney para comparação entre dois grupos isoladamente.

Experimento *in vitro*

- Obtenção dos blocos de dentes bovinos

Foram utilizados inicialmente 100 incisivos bovinos obtidos a partir de animais com idade entre 24 e 36 meses (CINTRA *et al.*, 2016a). Os procedimentos

realizados neste estudo foram aprovados no comitê de ética local (Processo FOA nº 00229-2017).

Após a extração e obtenção dos dentes, os mesmos foram limpos com curetas e, para evitar a proliferação bacteriana, os dentes foram armazenados em solução salina fisiológica contendo timol a 0,1% e mantidos em refrigerador em temperatura de 4°C, até o início da fase experimental.

Os dentes foram submetidos à profilaxia com auxílio de pedra-pomes e água e em seguida, tiveram as raízes separadas da coroa na junção amelo-cementária. As coroas foram fixadas em um dispositivo acoplado à plataforma de uma furadeira de bancada (modelo FGC-16, Ferrari, São Paulo, SP, Brasil). Com auxílio de uma ponta diamantada para corte de vidro (8 mm em diâmetro, Dinser Diamond Tools Ltda, Sacomã, SP, Brasil) e sob constante irrigação, foram obtidos discos de esmalte/dentina com 5,7mm de diâmetro, a partir do terço médio da face vestibular de cada dente (CINTRA et al., 2016a).

Todos os discos foram submetidos à regularização da superfície dentinária por meio de movimentos giratórios manuais sobre lixas de óxido de alumínio de granulação 400 e 600 (T469-SF-Noton, Saint-Gobain Abrasives Ltda, Jundiaí, SP, Brasil), até que apresentassem a espessura de 3,5 mm (aproximadamente 1,3 mm de esmalte e 2,2 mm de dentina, ± 2 mm), medidos em paquímetro digital (modelo 500-144B, Mitutoyo Sul América Ltda, SP, Brasil) (CINTRA et al., 2016a). Para remoção da smear layer, foi aplicada solução de EDTA 0.5M, pH 7,2 por 30 segundos (JACQUES & HEBLING 2005), seguido de lavagem com água deionizada.

- Seleção das amostras

Após a obtenção dos discos, os mesmos foram submetidos a uma leitura inicial prévia do valor de L^* , utilizando o aparelho espectrofotômetro de Reflexão Ultravioleta Visível, Modelo UV-2450 (Shimadzu, Kyoto, Japão), que utiliza o sistema de cores CIE $L^*a^*b^*$. Obtidos os valores L^* , foi calculada a média de toda a amostragem, sendo selecionados os 50 blocos dentários que apresentaram valores de L^* mais próximos do valor médio, respeitando a tolerância de 5% (CINTRA et al., 2016a).

- Preparo das Câmaras Pulpaes Artificiais (CPA) e sessão clareadora

Os discos de dentes bovinos foram adaptados às câmaras pulpaes artificiais. Cada CPA possui 2 compartimentos: a porção superior, com uma abertura de 8 mm de diâmetro, e a porção inferior, com 6 mm de abertura, permitindo o posicionamento e travamento adequado do espécime. A porção inferior possui perfurações laterais que permitiu a circulação da solução utilizada para quantificar o H_2O_2 penetrado no espécime. Ao redor dos espécimes posicionados nas CPAs, foram inseridos dois anéis de silicone, com diâmetro interno de 4,47 mm, e espessura de 1,78 mm (Ref. OR 008; Rodimar Rolamentos Ltda, Araraquara, SP, Brazil) (CINTRA *et al.*, 2016a).

Após a confecção das CPAs, com os blocos de dentes bovinos adaptados, foram realizados os tratamentos conforme já descrito anteriormente no experimento *in vivo*, de acordo com cada grupo experimental (Tabela 1).

- Quantificação da penetração trans-amelodentinária de H_2O_2

Para quantificar o H_2O_2 que penetrou através dos discos de esmalte e dentina, 1 mL de solução tampão de acetato (acetato de sódio 2M e ácido acético 2M, 1:1, pH=4,5) foram despejados em poços de placas de cultura celular, onde estavam acopladas as CPAs durante a sessão clareadora (Cintra *et al.*, 2016a). A superfície dentinária permaneceu em contato com essa solução tampão, e o H_2O_2 difundido através da estrutura dentária fez parte da mesma. Após o procedimento clareador, foram coletados 25µL da solução tampão contendo o H_2O_2 permeado, e adicionados à solução do corante violeta leucocristal (0,5 mg / mL; Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, EUA), e à solução contendo enzima peroxidase (1 mg / ml, Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, EUA) (BRISO *et al.*, 2014, CINTRA *et al.*, 2016a).

A coloração dessa mistura varia sua intensidade de acordo com a quantidade de H_2O_2 . Assim, como a absorbância é proporcional à concentração do H_2O_2 , é possível avaliar indiretamente a quantidade de H_2O_2 que difundiu da superfície dentária para a solução contida na CPA (Cintra *et al.*, 2016a). A leitura da solução foi realizada com o Espectrofotômetro de Reflexão Ultravioleta Visível*,

Modelo UV-2450 (Shimadzu, Kyoto, Japão), 30 minutos após cada sessão clareadora (CINTRA *et al.*, 2016a).

Os valores obtidos das leituras das soluções de concentração conhecida, e das obtidas das placas acrílicas após procedimento clareador, permitiram criar um gráfico de absorbância *versus* concentração, que foi utilizado para a determinação da difusão do H₂O₂ no interior da CPA.

- Avaliação da eficácia clareadora

Os espécimes foram submetidos à mensuração de suas cores em espectrofotômetro de Reflexão Ultravioleta Visível, Modelo UV-2450 (Shimadzu, Kyoto, Japão), após a sessão clareadora. Este aparelho utiliza o modelo de cores CIE L*a*b*, estabelecido pela Comissão Internationale de l'Eclairage – CIE (Comissão Internacional sobre Iluminação), que permite a especificação de percepções de cores em modelos tridimensionais. As leituras foram realizadas na superfície vestibular dos espécimes, e comparadas à leitura inicial, através do comprimento de onda *versus* reflexão. A axial “L” é conhecida como luminosidade e se estende de 0 (preto) a 100 (branco perfeito). A coordenada “a” representa a quantidade de vermelho (valores positivos) e de verde (valores negativos), enquanto a coordenada “b” representa a quantidade de amarelo (valores positivos) e de azul (valores negativos).

Para realização da leitura foram confeccionados suportes de silicone preto com o diâmetro (5,7mm) e espessura (3,5mm) para posicionamento padronizado dos discos de esmalte/dentina com o feixe de luz. A análise de cor foi realizada antes da sessão clareadora (T0), imediatamente após a sessão clareadora (T1) e 24 horas após (T2) (CINTRA *et al.*, 2016a). Foram realizadas três leituras para cada amostra, e calculada a média entre elas (CINTRA *et al.*, 2016a).

O sistema CIE L*a*b* calcula a distância de cor entre dois pontos através da fórmula:

$$\Delta E = [(\Delta L)^2 + (\Delta a)^2 + (\Delta b)^2]^{1/2}.$$

Os valores da penetração de peróxido de hidrogênio, e das leituras de cor, foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk para definir o teste estatístico a ser empregado. Todos os dados passaram no teste de normalidade, assim foi realizada a análise da variância (ANOVA) seguida do teste de Tukey para comparação entre as médias. Neste caso, por se tratar de avaliação métrica os dados foram expostos por meio das médias dos valores observados em cada grupo, em função dos períodos de observação. Foi considerado o nível de significância de 5% ($p < 0,05$). Todos os valores foram analisados com o Software SigmaPlot 12.0 (Chicago, IL, USA).

2.6 RESULTADOS

Experimento *in vivo*

Análise histológica

Grupo Controle

Os espécimes deste grupo apresentaram tecido pulpar com características de normalidade, apresentando camada de odontoblastos íntegra e em continuidade com as camadas de pré-dentina e dentina. Todos os espécimes em todos os terços não apresentaram concentração de células inflamatórias ou em número desprezível (Fig.1; A,a – Tab.3). Este grupo serviu de controle para comparação e identificação das alterações do tecido pulpar nos demais grupos experimentais.

Grupo CLA:

A maior parte dos espécimes deste grupo apresentou necrose no terço oclusal da polpa coronária, com algumas exceções que apresentaram infiltrado inflamatório severo em meio à desorganização do tecido pulpar e/ou necrose parcial. No terço médio, 2 espécimes apresentaram infiltrado inflamatório moderado, com permanência da desorganização celular, e os outros espécimes apresentaram necrose e infiltrado inflamatório severo. No terço cervical, a maior parte dos espécimes apresentou infiltrado inflamatório moderado, com alguns espécimes apresentando infiltrado inflamatório leve (Fig.1; B,b – Tab.3).

Grupo BS-CLA:

Os espécimes deste grupo apresentaram desorganização do tecido pulpar no terço oclusal da polpa coronária, com a maioria dos espécimes apresentando infiltrado inflamatório de moderado a severo e 2 espécimes apresentaram necrose. No terço médio foi observado tecido pulpar mais organizado, com inflamação discreta a moderada. No terço cervical, a maior parte dos espécimes não apresentou infiltrado inflamatório e alguns espécimes apresentaram infiltrado

inflamatório discreto, ficando próximo do padrão de normalidade do tecido pulpar. (Fig.1; C,c – Tab.3).

Grupo CLA+BS:

No terço oclusal deste grupo, 2 espécimes apresentaram infiltrado inflamatório severo, 4 espécimes apresentaram infiltrado discreto e outros 4 moderado, além de tecido pulpar parcialmente danificado. No terço médio, a maioria dos espécimes apresentaram infiltrado inflamatório discreto ou ausente, com 2 espécimes apresentando infiltrado inflamatório moderado. No terço cervical apenas 2 espécimes apresentaram infiltrado inflamatório discreto, enquanto a maioria dos espécimes apresentaram ausência de infiltrado inflamatório com organização tecidual semelhante ao encontrado no grupo controle. (Fig.1; D,d – Tab.3).

Grupo CLA+H₂O:

A maior parte dos espécimes deste grupo apresentou infiltrado inflamatório discreto no terço oclusal da polpa coronária, com algumas exceções que apresentaram infiltrado inflamatório moderado. No terço médio, a maioria dos espécimes apresentou ausência de infiltrado inflamatório em meio ao tecido com aspecto de normalidade, enquanto outros espécimes apresentaram infiltrado inflamatório discreto e 2 espécimes, à exceção, apresentaram infiltrado inflamatório severo. No terço cervical, todos os espécimes apresentaram ausência de infiltrado inflamatório, resultados semelhantes aos encontrados nos espécimes do grupo controle (Fig.1; E,e -Tab.3).

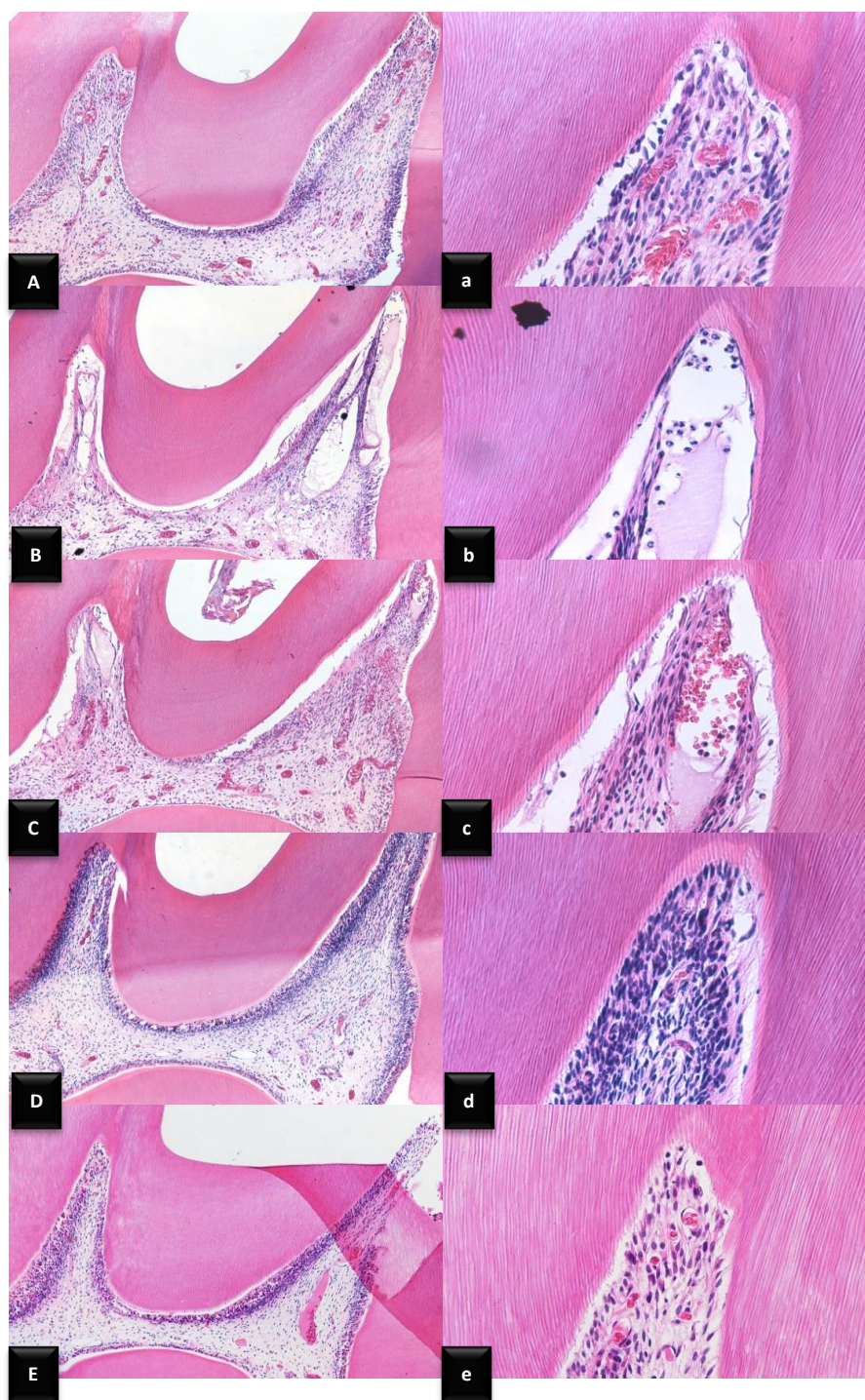


Figura 1. Fotomicrografias representativas dos espécimes dos grupos após 2 dias.

Controle: aspecto microscópico panorâmico evidenciando tecido pulpar normal; **(A)** região de corno pulpar **(a)**. CLA: Aspecto microscópico panorâmico mostrando desorganização do tecido pulpar e alterações severas; **(B)** extensa área de necrose no terço oclusal **(b)**. BS-CLA: inflamação severa no terço oclusal da polpa coronária **(C)** e área de necrose **(c)**. CLA+BS: Aspecto microscópico evidenciando organização tecidual **(D)** e aspecto de normalidade no corno pulpar **(d)**. CLA+H₂O: **(E)** Aspecto microscópico evidenciando organização tecidual; **(e)** corno pulpar evidenciando aspecto de normalidade [H.E.; 100x, 400x].

Tabela 3. Escores atribuídos para o infiltrado inflamatório após 2 dias

Terços	Escore	Grupos					Análise Estatística
		Controle	CLA	BS-CLA	CLA+BS	CLA+H ₂ O	
Oclusal	1	10/10	0/10	0/10	0/10	0/10	Kruskal-Wallis e Dunn: $P = <0,001$
	2	0/10	0/10	0/10	4/10	6/10	
	3	0/10	0/10	4/10	4/10	4/10	
	4	0/10	4/10	4/10	2/10	0/10	Mann-Whitney: CLAXBS-CLA: $P=0,026$
	5	0/10	6/10	2/10	0/10	0/10	
	Mediana*	1 ^a	5 ^b	4 ^{bc}	3 ^c	2 ^{ac}	
Médio	1	10/10	0/10	0/10	4/10	6/10	Kruskal-Wallis e Dunn: $P = <0,001$
	2	0/10	0/10	4/10	4/10	4/10	
	3	0/10	2/10	6/10	2/10	0/10	
	4	0/10	4/10	0/10	0/10	2/10	Mann-Whitney: CLAXBS-CLA $P = <0,001$
	5	0/10	4/10	0/10	0/10	0/10	
	Mediana*	1 ^a	4 ^b	3 ^{bc}	2 ^{ac}	1 ^{ac}	
Cervical	1	10/10	0/10	6/10	8/10	10/10	Kruskal-Wallis e Dunn: $P = <0,001$
	2	0/10	4/10	4/10	2/10	0/10	
	3	0/10	6/10	0/10	0/10	0/10	
	4	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	Mann-Whitney: CLAXBS-CLA $P = <0,001$
	5	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	
	Mediana*	1 ^a	3 ^b	1 ^{ab}	1 ^a	1 ^a	

*Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significante entre os grupos ($p < 0,05$).

Comparações entre os grupos

Na análise histológica, os escores atribuídos ao infiltrado inflamatório gerado pelo procedimento clareador foram comparados entre os grupos, e são apresentados na Tabela 3. O grupo CLA apresentou necrose no terço oclusal da polpa coronária, enquanto o BS-CLA apresentou inflamação moderada a severa, sendo semelhantes entre si ($p > 0,05$) e diferentes do Controle ($p < 0,05$). No terço médio o grupo CLA apresentou inflamação severa a necrose e o grupo BS-CLA, inflamação moderada, diferentes do Controle ($p < 0,05$). Já CLA+BS apresentou inflamação discreta a moderada no terço oclusal, sem diferença para o grupo BS-CLA ($p > 0,05$), e discreta a ausente no terço médio, sem diferença para o grupo BS-CLA e Controle ($p > 0,05$). O grupo CLA+H₂O apresentou inflamação leve no terço oclusal e leve a ausente no terço médio, sem diferença para o grupo CLA+BS e Controle ($p > 0,05$). No terço cervical, havia inflamação ausente nos grupos com CLA+BS e CLA+H₂O, sem diferença com o controle ($p > 0,05$), e inflamação leve a

ausente no grupo BS-CLA, sem diferença com os grupos CLA e Controle ($p>0,05$), enquanto o grupo CLA apresentou inflamação moderada, com diferença significativa com os grupos Controle, CLA+BS e CLA+H₂O ($p<0,05$). Na análise comparativa entre os grupos que receberam o gel clareador, pode-se notar uma diferença significativa ($p<0,05$) nos terços oclusal e médio da polpa coronária. Os grupos CLA+BS e CLA+H₂O destacaram-se por apresentar melhores resultados histológicos, sugerindo que o BS misturado ao gel clareador e o peróxido de hidrogênio diluído em menores concentrações possam minimizar o dano tecidual à polpa dentária.

Experimento *in vitro*

Quantificação da penetração trans-amelodentinária de H₂O₂

Após a análise estatística, o grupo CLA, que recebeu apenas a aplicação do gel clareador com peróxido de hidrogênio à 35%, apresentou a maior penetração de H₂O₂, com diferença significativa do grupo Controle ($p<0,05$). O grupo BS-CLA também apresentou uma alta taxa de penetração, sendo semelhante ao grupo CLA ($p>0,05$) e diferente do grupo controle ($p<0,05$). Entretanto, os grupos CLA+BS e CLA+H₂O apresentaram menor penetração de H₂O₂, sendo semelhantes ao grupo BS-CLA ($p>0,05$) e com diferença estatística para o grupo Controle e CLA ($p<0,05$). (Tabela 4.)

Tabela 4. Quantificação da penetração do H₂O₂ em cada grupo avaliado

	Cont	CLA	BS-CLA	CLA+BS	CLA+H ₂ O	P
Média ± DP*	0.11±0.18 ^a	4.18±0.42 ^b	3.94±0.80 ^{bc}	3.29±0.76 ^c	3.24±0.83 ^c	$p<0.001$

*Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significante entre os grupos ($p<0.05$).

Avaliação da eficácia clareadora

Na análise da alteração de cor imediata, com a variável ΔL , que representa a alteração de cor que varia do preto ao branco, o grupo controle não houve alteração significativa, uma vez que as amostras deste grupo não receberam aplicação de produto, servindo como uma análise comparativa para os demais grupos em todas as análises. Os valores dos grupos CLA, BS-CLA e CLA+BS foram altos para esta variável com diferença significativa do grupo Controle ($p < 0,05$). O grupo CLA+H₂O apresentou uma mediana menor, não apresentando diferença significativa entre o grupo controle e os demais grupos ($p > 0,05$). Após 24 horas, as medianas para todos os grupos diminuíram, exceto para o grupo CLA+BS que teve esse valor aumentado. Os grupos CLA, BS-CLA e CLA+BS continuaram apresentando diferença significativa ao grupo Controle ($p < 0,05$), enquanto o grupo CLA+H₂O continuou sem diferença significativa entre o grupo Controle e demais grupos ($p > 0,05$).

Na variável Δa , que representa as cores vermelho e verde, todos os grupos apresentaram valores de medianas baixos, sem diferença com o grupo Controle ($p > 0,05$). Após 24 horas, todas as medianas permaneceram reduzidas sem diferença significativa entre os grupos ($p > 0,05$).

Na análise de Δb , todos os valores foram estabelecidos em postos médios, e os valores dos grupos que receberam o gel clareador foram negativos, isso significa que ficaram em um tom mais próximo do azul após a clareação. Assim, todos os grupos apresentaram diferença significativa com o grupo Controle ($p < 0,05$), que permaneceu em um tom mais amarelado. Após 24 horas, as médias dos grupos clareados foram mais altas e com valores negativos, permanecendo diferentes estatisticamente do grupo Controle ($p < 0,05$).

Para o ΔE imediato, todos os grupos, exceto o Controle, apresentaram medianas altas, isso significa que houve variação na cor inicial. Os grupos CLA, BS-CLA e CLA+BS apresentaram diferença significativa com o grupo Controle e ($p < 0,05$) e foram semelhantes entre si ($p > 0,05$). O grupo CLA+H₂O apresentou a mediana mais baixa entre os grupos que receberam o gel clareador, o que

demonstra que este grupo sofreu menor alteração de cor, sem diferença com o grupo Controle e demais grupos ($p>0,05$). Após 24 horas, as alterações permaneceram as mesmas, com os grupos CLA, BS-CLA e CLA+BS diferentes do Controle ($p<0,05$) e o grupo CLA+H₂O semelhante ao Controle e demais grupos ($p>0,05$). (Tabela 5.)

Tabela 5. Quantificação da alteração de cor de cada grupo em diferentes períodos de análise.

Grupos (n=10)		Alteração de Cor Média ($\pm$ DP)/Mediana (min-máx)*			
		ΔL	Δa	Δb	ΔE
Imediata	Cont	-0.13 (-1.04 – 0.13) ^a	0.06 (-0.00 – 0.44) ^a	0.32 ($\pm$ 0.67) ^a	1.10 (0.79 – 1.42) ^a
	CLA	3.03 (2.03 – 4.78) ^b	0.20 (-0.43 – 0.06) ^a	-0.83 ($\pm$ 0.67) ^b	3.12 (2.65 – 4.80) ^b
	BS-CLA	2.63 (1.97 – 2.90) ^b	0.42 (-0.07 – 1.36) ^a	-1.28 ($\pm$ 0.96) ^b	3.10 (3.00 – 3.43) ^b
	CLA+BS	2.34 (1.51 – 3.17) ^b	0.60 (0.29 – 3.46) ^a	-0.75 ($\pm$ 0.57) ^b	3.30 (2.71 – 4.35) ^b
	CLA+H ₂ O	1.76 (0.71 – 2.21) ^{ab}	0.61 (0.24 – 1.80) ^a	-0.78 ($\pm$ 0.97) ^b	2.52 (1.84 – 3.17) ^{ab}
		ΔL	Δa	Δb	ΔE
24 h	Cont	-0.07 (-0.77 – 0.23) ^a	0.01 (-0.26 – 0.52) ^a	-0.38 ($\pm$ 0.69) ^a	0.92 (0.68 – 1.27) ^a
	CLA	2.54 (1.30 – 4.93) ^b	-0.04 (-0.18 – 0.34) ^a	-2.03 ($\pm$ 0.69) ^b	3.26 (3.12 – 5.20) ^b
	BS-CLA	1.81 (1.1 – 3.09) ^b	0.08 (-0.23 – 0.41) ^a	-2.46 ($\pm$ 0.87) ^b	3.32 (3.09 – 3.95) ^b
	CLA+BS	2.97 (1.50 – 3.60) ^b	0.10 (-0.09 – 0.87) ^a	-2.09 ($\pm$ 0.69) ^b	3.77 (3.54 – 4.21) ^b
	CLA+H ₂ O	0.89 (0.21 – 1.80) ^{ab}	-0.03 (-0.29 – 0.47) ^a	-2.36 ($\pm$ 0.73) ^b	2.84 (1.93 – 3.32) ^{ab}

*Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p<0.05$).

Comparações entre os grupos

Todos os grupos que receberam a aplicação do gel clareador sofreram penetração do H₂O₂ por esmalte e dentina e alteração de cor. Tornando-se mais brancos e azulados imediatamente após a aplicação do gel e permanecendo clareados após o período de 24 horas. Entretanto, os grupos CLA+BS e CLA+H₂O apresentaram menor penetração do H₂O₂, sendo diferentes do grupo que recebeu apenas o gel clareador ($p<0,05$). Por outro lado, somente o grupo CLA+BS apresentou alteração de cor imediatamente após a aplicação do produto semelhante

aos demais grupos clareados ($p>0,05$) e manutenção da alteração de cor após 24 horas, permanecendo diferente do grupo Controle ($p<0,05$). Estes resultados sugerem que o grupo CLA+BS tem uma menor penetração do H_2O_2 na estrutura dentária sem, contudo, prejudicar sua eficácia clareadora.

2.7 DISCUSSÃO

O emprego de compostos vítreos biocompatíveis vem sendo difundido em diversas interfaces da odontologia com resultados promissores (FROUM *et al.*, 1998, LIN *et al.*, 2000, AZENHA *et al.*, 2010). A partir destes resultados iniciais, uma nova formulação foi preparada a fim de ampliar os benefícios do uso deste material altamente biocompatível e com excelentes propriedades bioativas, o Biosilicato® (RORIZ *et al.*, 2010, RENNO *et al.*, 2013,).

O BS esteve associado ao procedimento clareador devido ao seu potencial remineralizante (CHINELATTI *et al.*, 2017, DE MORAIS *et al.*, 2018) que poderia atuar protegendo as estruturas dentárias da agressão causada pela difusão do H₂O₂ (TRINDADE *et al.*, 2009, SOARES *et al.*, 2013, MELLGREN *et al.*, 2018).

Na análise histológica foi possível verificar que após 2 dias da aplicação do gel de peróxido de hidrogênio a 35%, houve necrose na maioria dos espécimes avaliados no terço oclusal de polpa coronária, isto comprova o quão agressivo é o procedimento clareador ao tecido pulpar, corroborando os resultados de outros estudos (CINTRA *et al.*, 2016 a; b; c, BENETTI *et al.*, 2017; 2018). No entanto, em um primeiro estudo realizado com o BS misturado ao gel clareador houve menores danos teciduais, demonstrando apenas um processo inflamatório leve a moderado no terço oclusal da polpa coronária, com inflamação até ausente em alguns espécimes nos outros terços. E o BS aplicado antes do gel clareador apresentou também uma boa resposta em comparação à única aplicação do H₂O₂. Estes resultados sugeriram que há capacidade do BS em minimizar os danos gerados pelo procedimento clareador quando aplicado antes do gel clareador ou misturado a ele. Entretanto, restaram dúvidas quanto ao protocolo clínico ideal para o seu uso.

Esses resultados satisfatórios com o protocolo de aplicação da mistura do BS geraram um questionamento se o BS realmente tem efeito terapêutico ou se na mistura atua apenas como um diluente do gel clareador, reduzindo sua concentração, uma vez que já foi demonstrado que géis em menores concentrações promovem menos alterações estruturais (DE ARRUDA *et al.*, 2012, DE OLIVEIRA DUQUE *et al.*, 2017). Uma alternativa para resolver esta questão foi incluir uma

análise comparativa entre o gel clareador misturado ao BS e o gel clareador misturado à água como diluente.

Outra alternativa para avaliar qual o melhor protocolo de atuação do BS, foi introduzir o método *in vitro*, já utilizado em outros estudos sobre a clareação dentária para avaliar a alteração de cor e difusão dos géis clareadores por esmalte e dentina em diferentes protocolos e concentrações, a fim de identificar o método mais seguro e eficaz de clareação (BRISO *et al.*, 2014; 2015, CINTRA *et al.*, 2016), uma vez que já foi visto que o dano causado aos tecidos é proporcional à penetração do H_2O_2 contido no gel clareador (SOARES *et al.*, 2014, DE ALMEIDA *et al.*, 2015, LLENA *et al.*, 2018). Neste caso, ele responderia à dúvida se o BS atua de forma benéfica reduzindo a penetração do H_2O_2 e se há alteração na eficácia clareadora com a sua aplicação.

É importante avaliar a eficácia clareadora nestes casos porque embora géis clareadores com menores concentrações H_2O_2 causem menos danos na aplicação imediata, são necessárias mais aplicações do produto para que haja a alteração de cor e estética desejada e já foi demonstrado que a ação prejudicial do gel clareador é proporcional ao número de aplicações (CINTRA *et al.*, 2013). Assim, apenas optar por produtos menos concentrados pode não ser a alternativa ideal.

Do mesmo modo que produtos que tem efeito protetor às estruturas mas prejudicam a eficácia clareadora não trazem benefícios aos pacientes, produtos que potencializam a alteração de cor mas não minimizam a toxicidade do gel clareador também não têm utilidade (DUQUE *et al.*, 2014, ACUÑA *et al.*, 2019). Deste modo, o que se espera de uma formulação para que ela seja totalmente benéfica ao paciente é que ela reduza a difusão do H_2O_2 sem interferir no branqueamento (ORTECHO-ZUTA *et al.*, 2018, TORRES *et al.*, 2019). Isto não ocorreu neste estudo com o gel clareador diluído em água, que apesar de menor penetração do H_2O_2 , interferiu negativamente na alteração de cor.

Quanto aos outros resultados da análise *in vitro*, podemos sugerir que eles foram compatíveis com os resultados avaliados no segmento *in vivo*, que foi capaz de demonstrar que o grupo que teve o BS aplicado na mistura apresentou menor dano e mais superficial, uma vez que ele reduziu a penetração do gel clareador. Outro dado importante com relação a este grupo é que foi possível verificar que mesmo reduzindo a penetração do gel clareador, não houve diferença

na alteração de cor, inclusive após 24 horas da aplicação do produto. Esses resultados fortalecem a hipótese de que o BS misturado ao gel clareador possa ser o protocolo mais favorável, uma vez que ele minimiza os danos causados pelo gel clareador sem, contudo, alterar sua eficácia clareadora.

2.8 CONCLUSÃO

O BS aplicado antes do gel clareador ou na mistura reduz a inflamação causada pela clareação dentária. Além disso, o BS misturado ao gel clareador reduz a penetração do gel clareador em esmalte e dentina sem alterar a eficácia clareadora.

2.9 REFERÊNCIAS

Acuña, E.D. *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**, Feb, 2019 .

Azenha, M.R.; Peitl, O.; Barros, V.M. Bone response to biosilicates with different crystal phases. **Braz Dent J.**, v. 21, n. 5, p. 383-9, 2010.

Benetti, A.R. *et al.* In vitro penetration of bleaching agents into the pulp chamber. **Int Endod J.**, v. 37, n. 2, p. 120-4, 2004.

Bitter, N.C. A scanning electron microscopy study of the effect of bleaching agents on enamel: a preliminary report. **J Prosthet Dent.**, v. 67, n. 6, p. 852-5, Jun 1992.

Borges, A.B. *et al.* Effect of incorporation of remineralizing agents into bleaching gels on the microhardness of bovine enamel in situ. **J Contemp Dent Pract.**, v. 15, n. 2, p. 195-201, Mar 2014.

Briso, A.L. *et al.* Transenamel and Transdental Penetration of H₂O₂ in Restored Bovine Teeth. **J Adhes Dent.**, v. 17, n. 6, p. 529-34, Dec 2015 Dec.

Briso, A.L. *et al.* Transenamel and transdental penetration of hydrogen peroxide applied to cracked or microabraded enamel. **Oper Dent.**, v. 39, n.2, p.166-73, Mar – Apr.

Briso, A.L. *et al.* Effect of sodium ascorbate on dentin bonding after two bleaching techniques. **Oper Dent.**, v. 39, n. 2, p. 195-203, Mar-Apr 2014.

Camps, J. *et al.*. About I: Time-course diffusion of hydrogen peroxide through human dentin: clinical significance for young tooth internal bleaching. **J Endod.**, v. 33, p. 455-9, 2007.

Camps, J. *et al.* Influence of acid etching on hydrogen peroxide diffusion through human dentin. **Am J Dent.** V.23, n. 3, p. 168-70, Jun 2010.

Carminatt, M. *et al.* Capacidade de um gel de Biosilicato® em minimizar os danos causados ao tecido pulpar decorrente da clareação dentária. In: 30º Congresso Odontológico de Bauru, 2017, Bauru. **Journal of Applied Oral Science - Special Tissue**, v. 25, p. 89, 2017.

Chen, H.P. *et al.* Effect of fluoride containing bleaching agents on enamel surface properties. **J Dent.** v. 36, n. 9, p. 718-25, 2008.

Chinelatti, M.A. *et al.* Effect of a Bioactive Glass Ceramic on the Control of Enamel and Dentin Erosion Lesions. **Braz Dent J.** v. 28, n. 4, p. 489-97, Jul-Aug, 2017.

Cintra, L.T. *et al.* Penetration Capacity, Color Alteration and Biological Response of Two In-office Bleaching Protocols. **Braz Dent J.** v. 27, n. 2, p. 169-75, Apr 2016 a.

Cintra, L.T. *et al.* Evaluation of an experimental rat model for comparative studies of bleaching agents. **J Appl Oral Sci.** v. 24, n. 1, p. 95-104, Jan-Feb 2016 b.

Cintra, L.T. *et al.* The effect of dental bleaching on pulpal tissue response in a diabetic animal model. **Int Endod J.** v. 50, n. 8, p. 790-8, Oct, 2016c.

Cintra, L.T.A. *et al.*. The number of bleaching sessions influences pulp tissue damage in rat teeth. **J Endod.** v. 39, n. 12, p. 1576-80, 2013.

Curtis, A.R.; West, N.X.; Su, B. Synthesis of nanobioglass and formation of apatite rods to occlude exposed dentine tubules and eliminate hypersensitivity. **Acta Biomater.** v.6, n.9, p. 3740-6, 2010.

da Costa Soares, M.U. *et al.* Impact of remineralizing agents on enamel microhardness recovery after in-office tooth bleaching therapies. **Acta Odontol Scand.** V. 71, n. 2, p. 343-8, Mar, 2013.

Dahl, J.E.; Pallesen, U. Tooth bleaching--a critical review of the biological aspects. **Crit Rev Oral Biol Med.** v. 14, n. 4, p. 292- 304, 2003.

de Almeida, L.C. *et al.* Color alteration, hydrogen peroxide diffusion, and cytotoxicity caused by in-office bleaching protocols. **Clin Oral Investig.** v. 19, n. 3, p. 673-80, Apr, 2015.

de Arruda, A.M. *et al.* Effect of hydrogen peroxide at 35% on the morphology of enamel and interference in the de-remineralization process: an in situ study. **Oper Dent.** v.37, n. 5, p. 518-25, Sep-Oct, 2012.

de Moraes, R.C. *et al.* Bond strength of adhesive systems to sound and demineralized dentin treated with bioactive glass ceramic suspension. **Clin Oral Investig.** v. 22, n. 5, p. 1923-31, Jun, 2018.

de Oliveira, D.C.C. *et al.* Influence of enamel/dentin thickness on the toxic and esthetic effects of experimental in-office bleaching protocols. **Clin Oral Investig.** v. 21, n. 8, p. 2509-20, Nov, 2017.

Deng M. *et al.* Effects of 45S5 bioglass on surface properties of dental enamel subjected to 35% hydrogen peroxide. *Int J Oral Sci.* 2013 Jun;5(2):103-10.

Duque, C.C. *et al.* Bleaching effectiveness, hydrogen peroxide diffusion, and cytotoxicity of a chemically activated bleaching gel. **Clin Oral Investig.** v. 18, n. 6, p. 1631-7, Jul, 2014.

Efeoglu, N.; Wood, D.J.; Efeoglu, C. Thirty-five percent carbamide peroxide application causes in vitro demineralization of enamel. **Dent Mater.** v. 23, n. 7, p. 900-4, Jul, 2007.

Engle, K. *et al.* Erosion and abrasion of enamel and dentin associated with at-home bleaching: an in vitro study. **J Am Dent Assoc.** v. 141, n. 5, p. 546-51, May, 2010.

Federation Dentaire International. Recommended standard practices for biological evaluation of dental materials: FDI Commission of Dental Materials, Instruments, Equipment and Therapeutics. Part 4.1: subcutaneous implantation test. **Int Dent J.** v. 30, p. 140-88, 1980.

Ferreira, V.G. *et al.* Tooth bleaching induces changes in the vascular permeability of rat incisor pulps. **Am J Dent.** v. 26, n. 5, p. 298-300, Oct, 2013.

Froum, S.J.; Weinberg, M.A.; Tarnow, D. Comparison of bioactive glass synthetic bone graft particles and open debridement in the treatment of human periodontal defects. A clinical study. **J Periodontol.** v. 69, n. 6, p. 698-709, Jun, 1998.

Gjorgievska, E.; Nicholson, J.W. Prevention of enamel demineralization after tooth bleaching by bioactive glass incorporated into toothpaste. **Austr Dent J.** v. 56, p. 193-200, 2011.

Hannig, C. *et al.* Diffusion of peroxides through dentine in vitro with and without prior use of a desensitizing varnish. **Clin Oral Investig.** v. 15, n. 6, p. 863-8, Dec, 2011.

Hegedüs, C. *et al.* An atomic force microscopy study on the effect of bleaching agents on enamel surface. **J Dent.** v. 27, p. 509-15, 1999.

Herce,H.D. *et al.* A novel cell permeable DNA replication and repair marker. **Nucleus.** v. 5, n. 6, p. 590-600, Oct, 2014.

Jiang, T. *et al.* Investigation of the effects of 30% hydrogen peroxide on human tooth enamel by Raman scattering and laser-induced fluorescence. **J Biomed Opt.** v. 13, n. 1, p. 14-19, Jan- Feb, 2008.

Kina, J.F. *et al.* Response of human pulps after professionally applied vital tooth bleaching. **Int Endod J.** v. 43, n. 7, p. 572-80, Jul, 2010.

Lin, C.P. *et al.* Treatment of tooth fracture by medium energy CO₂ laser and DP-bioactive glass paste: compositional, structural, and phase changes of DP-bioglass paste after irradiation by CO₂ laser. **Biomaterials.** v. 21, n. 6, p. 637-43, Mar, 2000.

Llena, C. *et al.* Hydrogen Peroxide Diffusion through Enamel and Dentin. **Materials (Basel).** V. 11, n. 9, p. 12, Sep, 2018.

Marson, F.C. *et al.* Penetration of hydrogen peroxide and degradation rate of different bleaching products. **Oper Dent.** v. 40, n. 1, p. 72-9, Jan-Feb, 2015.

Mena-Serrano, A.P. *et al.* Effects of the concentration and composition of in-office bleaching gels on hydrogen peroxide penetration into the pulp chamber. **Oper Dent.** v. 40, n. 2, p. 76-82, Mar- Apr, 2015.

Ortecho-Zuta, U. *et al.* Effects of Enzymatic Activation of Bleaching Gels on Hydrogen Peroxide Degradation Rates, Bleaching Effectiveness, and Cytotoxicity. **Oper Dent.** v. 44, n. 4, p. 414-23, Jul-Aug, 2019.

Pintado-Palomino, K. *et al.* Clinical, randomized, controlled study on the use of desensitizing agents during tooth bleaching. **J Dent.** v. 43, n. 9, p. 1099-105, Sep, 2015.

Rahal, V. *et al.* Quantitative Sensory Testing of the Effect of Desensitizing Treatment After Dental Bleaching. **Acta Odontol Latinoam.** v. 28, n. 3, p. 263-70, Dec. 2015.

Renno, A.C. *et al.* Characterization and in vivo biological performance of biosilicate. **Biomed Res Int.** Sep, 2013.

Roderjan, D.A. *et al.* Response of human pulps to different in-office bleaching techniques: preliminary findings. **Braz Dent J.** v. 26, n. 3, p. 242-8, May-Jun, 2015.

Roriz, V M. *et al.*, Efficacy of a bioactive glass-ceramic (Biosilicate) in the maintenance of alveolar ridges and in osseointegration of titanium implants. **Clin Oral Implants Res.** V. 21, n. 2, p. 148-55, Feb, 2010.

Rotstein, I. *et al.* Histochemical analysis of dental hard tissues following bleaching. **J Endod.** v. 22, p. 23-5, 1996.

Samorodnitzky-Naveh, G.R. *et al.* Patients' self-perception of tooth shade in relation to professionally objective evaluation. **Quintessence Int.** v. 41, n. 5, p. 80-3, May, 2010.

Schulte, J.R. *et al.* The effects of bleaching application time on the dental pulp. **J Am Dent Assoc.** v. 125, n. 10, p. 1330-5, Oct, 1994.

Seale, N.S.; McIntosh, J.E.; Taylor, A.N. Pulpal reaction to bleaching of teeth in dogs. **J Dent Res.** v. 80, p. 948-53, 1981.

Soares, D.G. *et al.* Concentrations of and application protocols for hydrogen peroxide bleaching gels: effects on pulp cell viability and whitening efficacy. **J Dent.** v. 42, n. 2, p. 185-98, Feb, 2014.

Soares, D.G. *et al.* Effective tooth-bleaching protocols capable of reducing H_2O_2 diffusion through enamel and dentine. **J Dent.** v. 42, n. 3, p. 351-8, Mar, 2014.

Tirapelli, C. *et al.* The effect of a novel crystallised bioactive glass-ceramic powder on dentine hypersensitivity: a long-term clinical study. **J Oral Rehabil.** v. 38, n. 4, p. 253-62, Apr, 2011.

Tirapelli, C. *et al.* A novel bioactive glass-ceramic for treating dentin hypersensitivity. **Braz Oral Res.** v. 24, n. 4, p. 381-7, Oct – Dec, 2010.

Torres, C. *et al.* Effect of Calcium and Fluoride Addition to Hydrogen Peroxide Bleaching Gel On Tooth Diffusion, Color, and Microhardness. **Oper Dent.** v. 44, n. 4, p. 424-32, Jan, 2019.

Torres, C.R. *et al.* Influence of concentration and activation on hydrogen peroxide diffusion through dental tissues in vitro. **ScientificWorldJournal.** v.18, p. 193-241, Sep, 2013.

Trindade, F.Z. *et al.* Trans-enamel and trans-dentinal cytotoxic effects of a 35% H_2O_2 bleaching gel on cultured odontoblast cell lines after consecutive applications. **Int Endod J.** v. 42, n. 6, p. 516-24, Jun, 2009.

Mellgren, T. *et al.* Calcium Phosphate Microspheres as a Delivery Vehicle for Tooth-Bleaching Agents. **J Dent Res.** v. 97, n. 3, p. 283-8, Mar, 2018.

Türkun, M. *et al.* Effects of 10% carbamide peroxide on the enamel surface morphology: a scanning electron microscopy study. **J Esthet Restor Dent.** v. 14, n. 4, p. 238-44, 2002.

Vollenweider, M. *et al.* Remineralization of human dentin using ultrafine bioactive glass particles. **Acta Biomater.** v. 3, n. 6, p. 936-43, 2007.

Xu, B.; Li, Q.; Wang, Y. Effects of pH values of hydrogen peroxide bleaching agents on enamel surface properties. **Oper Dent.** v. 36, n. 5, p. 554-62, Sep-Oct, 2011.

3 CAPÍTULO 2 -

**Efeito terapêutico do Biosilicato® frente ao estresse
oxidativo pulpar e sensibilidade dentária decorrente do
procedimento clareador**

3.1 RESUMO

Este estudo investigou o mecanismo de ação e a capacidade dessensibilizante do Biosilicato®, quando aplicado antes ou misturado ao gel clareador, sobre o tecido pulpar de molares de ratos Wistar, por meio das análises histológica em H.E e da marcação imunoistoquímica para PCNA, HO-1, TNF- α e Substância P. Hemi-maxilas de 20 ratos Wistar foram divididas aleatoriamente em 4 grupos (n=10): Controle- não recebeu tratamento; CLA- recebeu 30 min do gel clareador H₂O₂ 35%; BS-CLA- recebeu 20 min do gel de BS, seguido de 30 min do H₂O₂ 35%; CLA+BS- recebeu 30 min da mistura do H₂O₂ 35% com o gel BS (1:1). Após 2 dias, os animais foram mortos e as hemi-maxilas separadas para análise histológica em H.E. e imunoistoquímica para PCNA, HO-1, TNF- α e Substância P. Foram atribuídos escores à inflamação e à imunomarcação de TNF- α , e submetidos aos testes de Kruskal-Wallis e Dunn ($p < 0,05$). Para análise da área correspondente à imunomarcação obtida através da densidade óptica de imunomarcação da Substância P foi realizada a análise da variância (ANOVA) seguida do teste de Tukey para comparação entre as médias. Foram realizadas as contagens das células imunomarcadas para HO-1 e PCNA, e foram submetidas ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk para definir o teste estatístico ($p < 0,05$). Na análise histológica, o grupo CLA apresentou predominantemente necrose no terço oclusal da polpa coronária, e inflamação severa no terço médio, enquanto o BS-CLA apresentou inflamação severa no terço oclusal e moderada no terço médio, ambos diferentes do Controle ($p < 0,05$). Já CLA+BS apresentou inflamação moderada no terço oclusal e leve no terço médio, sem diferença para o grupo BS-CLA e controle ($p > 0,05$). No terço cervical, houve inflamação leve nos grupos com BS, e moderada no grupo CLA ($p < 0,05$). Na análise imunoistoquímica para o imunomarcador TNF- α , foi visto que o grupo CLA apresentou padrão alto de imunomarcação nos 3 terços da polpa coronária, sendo diferente do grupo Controle ($p < 0,05$). Enquanto os grupos BS-CLA e CLA+BS apresentaram padrão baixo ou moderado de imunomarcação para TNF- α em todos os terços da polpa coronária, sem diferença com o grupo Controle ($p > 0,05$). A densidade óptica de imunomarcação para Substância P foi maior no grupo CLA, comparada a todos os grupos e em todos os terços da polpa coronária ($p < 0,05$). Ainda, os grupos BS-CLA e CLA+BS

apresentaram densidade óptica semelhante ao controle no terço oclusal ($p>0,05$), e inferior ao controle no terço médio e cervical ($p<0,05$). Quanto à proliferação celular, no terço oclusal, observou-se alta proliferação no grupo BS-CLA seguido de CLA+BS, sendo ambos, diferentes do controle ($p<0,05$). No terço médio, o grupo CLA apresentou a maior imunomarcagem para PCNA seguido do grupo BS-CLA, sendo ambos diferentes do grupo Controle ($p<0,05$). Já o grupo CLA+BS não diferiu de nenhum grupo ($p>0,05$). No terço cervical, o grupo BS-CLA apresentou maior marcação, seguido de CLA e CLA+BS, sendo os 3 diferentes do controle ($p<0,05$). Na contagem de células imunomarcadas para HO-1, os grupos CLA e BS-CLA apresentaram grande quantidade de células imunomarcadas no terço oclusal da polpa coronária, sendo diferentes do grupo Controle ($p<0,05$), e o grupo CLA+BS também apresentaram diferença com o grupo Controle e CLA ($p<0,05$). No terço médio, os grupos BS-CLA e CLA+BS não apresentaram diferença do grupo CLA e Controle ($p>0,05$) e foram semelhantes entre si ($p>0,05$), contudo, o grupo CLA foi diferente do grupo Controle ($p<0,05$) em todos os terços da polpa coronária. No terço cervical, o grupo CLA+BS foi diferente dos grupos Controle e BS-CLA ($p<0,05$) e semelhante ao grupo CLA ($p>0,05$), que não foi diferente também do grupo BS-CLA ($p>0,05$). **Conclusão:** O Biosilicato® é capaz de reduzir o dano causado pelo gel clareador, diminuindo a inflamação, auxiliando no processo de reparo e atuando como um dessensibilizante.

Palavras Chave: Clareamento Dental. Peróxido de Hidrogênio. Pulpite.

3.2 ABSTRACT

This study investigated the mechanism of action and the desensitizing ability of Biosilicate®, when applied before or mixed with the bleaching gel, on the pulp tissue of Wistar rat molars, through histological analysis in HE and immunohistochemical labeling for PCNA, HO-1, TNF- α and Substance P. Hemi-maxilla of 20 Wistar rats were randomly divided into 4 groups (n=10): Control- received no treatment; CLA- received 30 min of the 35% H₂O₂ bleaching gel; BS-CLA- received 20 min of BS gel, followed by 30 min of 35% H₂O₂; CLA+BS- received 30 min of the mixture of 35% H₂O₂ with the BS gel (1:1). After 2 days, the animals were killed and the hemi-maxilla separated for histological analysis in HE and immunohistochemistry for PCNA, HO-1, TNF- α and P-Substance. Scores were assigned to TNF- α inflammation and immunostaining, and submitted to the Kruskal-Wallis and Dunn tests ($p < 0.05$). For the analysis of the area corresponding to the immunostaining obtained through the optical density of the Substance P, an analysis of the variance (ANOVA) was performed, followed by the Tukey test for comparison between the means. We counted the immunolabelled cells for HO-1 and PCNA and were submitted to the Shapiro-Wilk normality test to define the statistical test ($p < 0.05$). In the histological analysis, the CLA group presented predominantly necrosis in the occlusal third of the coronary pulp, and severe inflammation in the middle third, while the BS-CLA presented severe inflammation in the occlusal third and moderate in the middle third, both different from the Control ($p < 0.05$). However, CLA+BS presented moderate inflammation in the occlusal third and light in the middle third, with no difference for the BS-CLA group and control ($p > 0.05$). In the cervical third, there was mild inflammation in the BS groups, and moderate in the CLA group ($p < 0.05$). In the immunohistochemical analysis for the TNF-alpha immunomarker, it was observed that the CLA group presented a high pattern of immunostaining in the 3-thirds of the coronary pulp, being different from the Control group ($p < 0.05$). While the BS-CLA and CLA+BS groups presented a low or moderate pattern of TNF-alpha immunostaining in all thirds of the coronary pulp, with no difference in the Control group ($p > 0.05$). The optical density of immunostaining for Substance P was higher in the CLA group, compared to all groups and in all thirds of the coronary pulp ($p < 0.05$). Also, the BS-CLA and CLA+BS groups had similar optic

density to the control in the occlusal third ($p>0.05$), and inferior to the control in the middle and cervical thirds ($p<0.05$). As for cell proliferation, in the occlusal third, there was a high proliferation in the BS-CLA group followed by CLA+BS, both of which were different from the control ($p<0.05$). In the middle third, the CLA group presented the highest immunostaining for PCNA followed by the BS-CLA group, both of which were different from the Control group ($p<0.05$). The CLA+BS group did not differ from any group ($p>0.05$). In the cervical third, the BS-CLA group presented greater marking, followed by CLA and CLA+BS, being the 3 different ones of the control ($p<0.05$). The CLA and BS-CLA groups showed a large number of cells immunolabelled in the occlusal third of the coronary pulp, being different from the Control group ($p<0.05$), and the CLA+BS group presented difference with the Control and CLA groups ($p<0.05$). In the middle third, the BS-CLA and CLA+BS groups showed no difference between the CLA and Control groups ($p>0.05$) and were similar among themselves ($p>0.05$), however, the CLA group was different from the CLA Control ($p<0.05$) in all thirds of the coronary pulp. In the cervical third, the CLA + BS group was different from the Control and BS-CLA groups ($p<0.05$) and similar to the CLA group ($p>0.05$), which was not different also from the BS-CLA group ($p>0.05$). Conclusion: Biosilicate® is able to reduce the damage caused by bleaching gel, reducing inflammation, aiding in the repair process and acting as a desensitizer.

Key words: Tooth Bleaching. Hydrogen Peroxide. Pulpitis.

3.3 INTRODUÇÃO

Pacientes submetidos à clareação dentária consideram-se satisfeitos, refletindo um impacto psicossocial positivo na qualidade de vida desses indivíduos, mesmo à longo prazo (FERNÁNDEZ *et al.*, 2016). Por outro lado, a literatura atual tem demonstrado que, apesar de sua ação benéfica, a clareação de dentes vitais pode proporcionar danos às estruturas dentárias, tanto ao esmalte e dentina (BISTEY *et al.*, 2007, DENG *et al.*, 2013, COCESKA *et al.*, 2016) quanto ao tecido pulpar (COSTA *et al.*, 2010, RODERJAN *et al.*, 2015), gerando consequências negativas como a sensibilidade dentária (HAYWOOD 2005, MEIRELES *et al.*, 2014).

Já foi comprovado que as técnicas usualmente utilizadas para a clareação de dentes vitais resultam em um aumento da dor provocada por estímulos térmicos e alterações de pH (HAYWOOD 2005). Esta sensibilidade afeta também dentes hígidos, ao contrário da sensibilidade comum, que ocorre na presença de dentina exposta ou trincas no esmalte (HAYWOOD 2005).

Por ser um produto desenvolvido a base de vitrocerâmica bioativa, o Biosilicato® mostrou-se como uma nova opção para o tratamento da hipersensibilidade dentinária (TIRAPELLI *et al.*, 2010; 2011). Também mostrou capacidade em minimizar a sensibilidade dentária decorrente do procedimento clareador (PINTADO-PALOMINO *et al.*, 2015).

Em um estudo anterior, vimos que o BS aplicado antes ou na mistura do gel clareador é capaz de minimizar os danos causados pela clareação dentária. Além disso, o BS adicionado ao gel clareador pode reduzir a penetração do H₂O₂ sem prejudicar a eficácia clareadora. A partir destes resultados, surgem algumas dúvidas sobre o modo de ação e aplicabilidade clínica do BS em associação ao procedimento clareador que podem ser verificadas pela análise imunoistoquímica de marcadores biológicos como PCNA, HO-1, TNF- α e pela análise histológica em H.E.

O Antígeno Nuclear de Proliferação Celular (PCNA) é uma proteína presente no núcleo das células, e está associada à proliferação de células de origem normal ou transformadas (DA COSTA FILHO *et al.*, 2002). Foi observado que o PCNA está presente durante o processo de reparo pulpar após o procedimento

clareador, indicando a capacidade destas células em responder ao estresse oxidativo (BENETTI *et al.*, 2017).

A Heme-Oxigenase 1 (HO-1) é uma proteína celular que tem sua expressão desencadeada como resultado de diversos estímulos de estresse, principalmente relacionado à liberação de espécies reativas de oxigênio (OTTERBEIN & CHOI 2000, COOPER *et al.*, 2007, PAE & CHUNG 2009). A presença desta proteína foi observada em odontoblastos e células endoteliais após procedimento clareador (ANDERSON *et al.*, 1999).

O Fator de Necrose Tumoral (TNF)- α é uma citocina pró-inflamatória que atua como um importante mediador de lesões teciduais (TANSEY & SZYMKOWSKI 2009), iniciando a cascata da inflamação (ELSALHY *et al.*, 2013). Maiores níveis deste marcador foram observados no tecido pulpar inflamado (LI *et al.*, 2015), e também no tecido pulpar de molares de ratos após clareação dentária (BENETTI *et al.*, 2018).

A Substância P é um neuropeptídeo relacionado a nocicepção (resposta aos estímulos dolorosos) e tem sua produção elevada no tecido pulpar submetido ao agente clareador (CAVIEDES-BUCHELI *et al.*, 2008).

Diante do exposto, procurou-se desenvolver um estudo que preenchesse algumas das lacunas existentes e relacionadas ao uso do Biosilicato® e dos géis clareadores a respeito do seu mecanismo de ação junto ao tecido pulpar após a clareação dentária e um protocolo adequado para aplicação clínica.

3.4 OBJETIVO

Investigar o mecanismo de ação e a capacidade dessensibilizante do Biosilicato®, quando aplicado antes ou misturado ao gel clareador, sobre o tecido pulpar de molares de ratos Wistar, por meio da análise histológica em H.E e imunoistoquímica para PCNA, HO-1, TNF- α e Substância P.

3.5 MATERIAIS E MÉTODOS

- Animais

Foram utilizados 20 ratos machos (*Rattus norvegicus 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 realizados neste estudo foram aprovados no comitê de ética local (Processo FOA nº 00229-2017).

- Drogas empregadas

Para anestesia dos animais foi utilizado via intramuscular um sedativo à base de Cloridrato de xilazina 2% (Xilazin, Syntec do Brasil LTDA – Cotia, São Paulo, Brasil) na dosagem de 10mg por quilograma de peso corporal, e um anestésico à base de Cloridrato de Cetamina a 10% (Ketamina Agener, União Química Farmacêutica Nacional S/A – Embu-Guaçu, São Paulo, Brasil) na dosagem de 80 mg por quilograma de peso corporal. Para eutanásia, foi utilizado um anestésico via intraperitoneal à base de tiopental sódico (Thiopentax, Cristália – Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda – Itapira, SP, Brasil) na dosagem de 150mg por quilograma de peso corporal.

- Agente Clareador

Foi utilizado o produto clareador disponível no mercado, à base de peróxido de hidrogênio a 35%, Whiteness HP Maxx (FGM Produtos Odontológicos - Joinville, SC, Brasil). 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 remineralizante

Foi utilizado um gel experimental à base de Biosilicato®, produzido a partir do pó de BS desenvolvido no Laboratório de Materiais Vítreos, da Universidade Federal de São Carlos (TIRAPELLI *et al.*, 2010, TIRAPELLI *et al.*, 2011, PINTADO-PALOMINO *et al.*, 2015).

- 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	Procedimento pré-clareação	Clareação dentária
Controle	-	-
CLA	-	1 aplicação de 30 minutos do gel clareador
BS-CLA	30 segundos de fricção + 20 minutos de permanência do gel de BS	1 aplicação de 30 minutos do gel clareador
CLA+BS	-	1 aplicação de 30 minutos do gel clareador misturado com o gel de BS (1:1)

- Sessão clareadora

Todos os animais foram anestesiados via intramuscular com uma associação do sedativo à base de Xilazina 2% (10mg/Kg) e o anestésico à base de cloridrato de Ketamina 10% (80 mg/Kg).

Distribuídos de forma aleatória, os molares de cada lado receberam os tratamentos como se segue:

- Grupo Controle: não recebeu qualquer produto;

- Grupo CLA: foi realizada a aplicação e fotoativação da barreira gengival resinosa (Top Dam – FGM Produtos Odontológicos - Joinville, SC, Brasil), e em seguida, foi aplicado aproximadamente 0,01 mL de H₂O₂ 35% (KRAIGHER *et al.*, 2006, CINTRA *et al.*, 2013), que permaneceu em contato com o esmalte por 30 minutos (CINTRA *et al.*, 2016b);
- Grupo BS-CLA: foi realizada a aplicação do BS friccionado com microbrush sobre a superfície do esmalte por 30 segundos, e repousou por 20 minutos (adaptado de TIRAPELLI *et al.*, 2011 e DENG *et al.*, 2013). Em seguida foi realizado o procedimento clareador como no grupo CLA;
- Grupo CLA+BS: foram aplicados 0,01 mL da mistura do gel clareador com o gel de BS, na proporção de 1:1, que permaneceu em contato com o esmalte por 30 minutos (adaptado de DENG *et al.*, 2013).

Após cada tratamento realizado, a superfície do dente foi limpa com algodão e papel absorvente e lavada abundantemente com água, e a barreira gengival retirada.

- Eutanásia e processamento laboratorial

Decorrido o período pré-determinado de 2 dias após o procedimento clareador (KINA *et al.*, 2010, COSTA *et al.*, 2010, CINTRA *et al.*, 2013), os animais foram mortos com 150mg/Kg de Tiopental (anestésico). Após a morte, foi removida toda a pele correspondente à face direita do animal e com dois cortes realizados com tesoura no ângulo da boca, foi realizada a separação da mandíbula e maxila. 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 e esquerdo, possibilitando a obtenção das hemimaxilas direita e esquerda.

As hemimaxilas foram colocadas imediatamente em frascos individuais devidamente identificados, contendo solução formalina a 10%, tamponada com pH neutro, durante as primeiras 20 horas e depois lavadas em água corrente por um

período de 12 horas. Após a fixação, as peças foram desmineralizadas em solução de EDTA 10%.

As hemimaxilas foram então lavadas em água corrente, desidratadas em álcool, diafanizadas em xilol e incluídas em parafina. A orientação no momento da inclusão permitiu a realização de cortes teciduais dos molares superiores e estruturas de suporte em seu sentido longitudinal. Após inclusão, as peças foram cortadas com cortes semi-seriados, com 5 µm de espessura, realizados em micrótomo (Leica - RM 2045). Para fins de padronização, foi selecionada a raiz mesial do primeiro molar superior em cortes que proporcionam a visualização desta raiz em seu sentido longitudinal pleno. Esta raiz serviu de orientação durante a realização dos cortes, e foram selecionados os cortes centrais da câmara pulpar. Para cada espécime, 02 lâminas com 3 cortes teciduais da polpa dentária cada, foram preparadas e coradas com Hematoxilina e Eosina e outras 04 lâminas foram submetidas à técnica de imunistoquímica para PCNA, HO-1, TNF-α e Substância P.

Para a técnica da imunistoquímica, os cortes histológicos foram desparafinizados em xilol e hidratados em série decrescente de etanol (100°- 100°- 100°- 90°- 70° GL). A recuperação antigênica foi realizada por meio da imersão das lâminas histológicas em tampão Diva Decloaker® (Biocare Medical – Pacheco, CA, USA), em câmara pressurizada Decloaking Chamber® (Biocare Medical – Pacheco, CA, USA), a 95°C, por 10 minutos. Após lavagens em tampão fosfato salino (PBS) 0,1M, pH 7,4, as lâminas histológicas foram imersas em 3% de peróxido de hidrogênio, por 1 hora, para o bloqueio da peroxidase endógena. Em seguida, depois de lavagens em PBS, os cortes histológicos foram tratados com 3% de soro albumina bovino por 12 horas, para bloqueio dos sítios inespecíficos.

Lâminas histológicas contendo amostras de todos os grupos experimentais foram submetidas à incubação com os anticorpos primários: anti-PCNA do rato gerado em camundongo (VP-P980, Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, EUA), anti-HO-1 do rato gerado em coelho (H4535, Sigma-AldrichCo. LLC, St. Louis, MO, EUA), anti-TNF-α do rato gerado em cabra (SC-1350, Santa Cruz Biotechnology, CA, EUA) e anti-Substância P do rato produzido em coelho (orb13610, Biorbyt Ltda, San Francisco, CA, Estados Unidos). Os anticorpos primários foram diluídos em PBS acrescido de 0,1% Triton X-100 (PBS-TX), durante

24 horas, em câmara úmida. Nas etapas subsequentes foi empregado o Universal Dako Labeled (HRP) Streptavidin-Biotin Kit® (Dako Laboratories - Denmark, CA, USA). Após lavagens, as secções histológicas foram incubadas no anticorpo secundário biotinilado, durante 2 horas, lavadas, e tratadas com estreptavidina conjugada com a peroxidase da raiz forte (HRP), por 1 hora. Depois de três lavagens em PBS-TX procedeu-se a revelação utilizando-se como cromógeno o 3,3'- tetracloridrato de diaminobenzidina (DAB chromogen Kit®, Dako Laboratories, CA, USA). Ao término de uma série de lavagens em PBS, os cortes histológicos destinados à marcação por TNF- α foram contracorados com hematoxilina de Harris para análise do infiltrado inflamatório e as lâminas destinadas à marcação para PCNA e HO-1 contracorados com *Fastgreen* para marcação dos núcleos celulares. Como controle negativo, os espécimes foram submetidos aos procedimentos descritos anteriormente suprimindo-se a utilização do anticorpo primário.

- Análise dos resultados para a coloração de H.E.

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

Análise Qualitativa: A análise qualitativa dos cortes teciduais corados por H.E. foi realizada por meio da atribuição de escores. Esta análise consiste na avaliação das condições histopatológicas das estruturas examinadas, em itens distintos, atribuindo magnitudes registradas sob a forma de escores de 1 a 5 para resposta inflamatória (BENETTI *et al.*, 2017) (Tabela 2), possibilitando uma análise estatística por meio do Software SigmaPlot 12.0 (Systat Software Inc. - Chicago, IL, USA).

A intensidade do processo inflamatório foi analisada em conformidade com o número médio aproximado de células inflamatórias presentes em diferentes campos, de um mesmo espécime, examinados em aumento de 400X.

Tabela 2. Escores atribuídos para a resposta inflamatória.

Escore	Descrição
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.

- Análise das amostras submetidas à imunomarcação

As secções histológicas foram analisadas sob iluminação de campo claro em microscópio óptico (Optiphot-2, Nikon, Japão) por um investigador que desconhecia os grupos experimentais que estivessem sendo analisados. A imunomarcação foi definida como aquela de coloração acastanhada presente no citoplasma das células e/ou na matriz extracelular para TNF- α e Substância P, e no núcleo da célula para PCNA e HO-1.

A análise qualitativa para TNF- α foi efetuada utilizando-se cinco secções histológicas de cada animal e ao padrão de imunomarcação foi atribuído um escore (FERREIRA *et al.*, 2018) (Tabela 3).

A análise quantitativa para a Substância P foi realizada através da demarcação de uma área correspondente à imunomarcação obtida através da densidade óptica de imunomarcação utilizando uma ferramenta de limiar de cores do software de análise de imagem (Axiovision 4.8.2® Carl Zeiss) (KING *et al.*, 2002).

A quantificação da imunomarcação de PCNA e HO-1 foi realizada através da contagem das células com núcleo acastanhado, em cada terço da polpa, e expressas em quantidade de células por mm² (BENETTI *et al.*, 2017).

Tabela 3. Escores atribuídos para o padrão de imunomarcacão para TNF- α

Escore	Descrição
1	Ausência de imunomarcacão;
2	Baixo padrão de imunomarcacão;
3	Moderado padrão de imunomarcacão;
4	Alto padrão de imunomarcacão;
5	Padrão extremamente alto de imunomarcacão.

A avaliação microscópica das lâminas coradas em H.E. e da imunomarcacão foi efetuada por um observador cego calibrado que determinou os escores para cada espécime e a contagem das células imunomarcadas. Os resultados de cada grupo experimental foram apresentados por meio de uma análise comparativa.

De posse dos dados obtidos na forma de escores foi realizado o teste de Kruskal-Wallis e quando observada alguma diferença significativa, foi realizado o cruzamento entre os grupos, pelo teste de comparações múltiplas de Dunn.

A contagem das células imunomarcadas e a análise da Substância P foram submetidas ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk para definir o teste estatístico a ser empregado. Os dados que passaram no teste de normalidade foram submetidos à análise da variância (ANOVA) seguida do teste de Tukey para comparação entre as médias. Neste caso, por se tratar de avaliação métrica os dados foram expostos por meio das médias dos valores observados em cada grupo, em função dos períodos de observação. Para os dados que não passaram no teste de normalidade foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis e quando observada alguma diferença significativa, foi realizado o cruzamento entre os grupos, pelo teste de comparações múltiplas de Dunn. Para todos os testes empregados foi considerado o nível de significância de 5% ($p < 0,05$). Todos os valores foram analisados com o Software SigmaPlot 12.0 (Chicago, IL, USA).

3.6 RESULTADOS

Análise histológica

Grupo Controle: Os espécimes deste grupo apresentaram tecido pulpar com características de normalidade, apresentando camada de odontoblastos íntegra e em continuidade com as camadas de pré-dentina e dentina. Todos os espécimes em todos os terços apresentaram o tecido isento de células inflamatórias ou em número desprezível (Fig.1 – Tab.4). Este grupo serviu de controle para comparação e identificação das alterações do tecido pulpar nos demais grupos experimentais.

Grupo CLA: A maior parte dos espécimes deste grupo apresentou necrose no terço oclusal da polpa coronária, com algumas exceções que apresentaram infiltrado inflamatório severo em meio à desorganização do tecido pulpar e/ou necrose parcial. No terço médio, 2 espécimes apresentaram infiltrado inflamatório moderado, com permanência da desorganização celular, outros 2 espécimes apresentaram necrose, entretanto a maioria apresentou infiltrado inflamatório severo. No terço cervical, a maior parte dos espécimes apresentou infiltrado inflamatório moderado, com alguns espécimes apresentando infiltrado inflamatório leve (Fig.1 – Tab.4).

Grupo BS-CLA: Os espécimes deste grupo apresentaram desorganização do tecido pulpar no terço oclusal da polpa coronária, com metade dos espécimes apresentando infiltrado inflamatório severo e metade infiltrado inflamatório moderado. No terço médio foi observado tecido pulpar mais organizado, com inflamação discreta a moderada. No terço cervical, a maior parte dos espécimes não apresentou infiltrado inflamatório e alguns espécimes apresentaram infiltrado inflamatório discreto, ficando próximo do padrão de normalidade do tecido pulpar. (Fig.1 – Tab.4).

Grupo CLA+BS: No terço oclusal deste grupo, 2 espécimes apresentaram tecido pulpar com aspecto de normalidade e sem infiltrado

inflamatório significativo. Já 4 espécimes apresentaram infiltrado discreto e outros 4 moderado, além de tecido pulpar parcialmente danificado. No terço médio e cervical, a maioria dos espécimes apresentaram infiltrado inflamatório discreto e ausente, respectivamente, com resultados semelhantes aos encontrados no grupo controle. (Fig.1 – Tab.4).

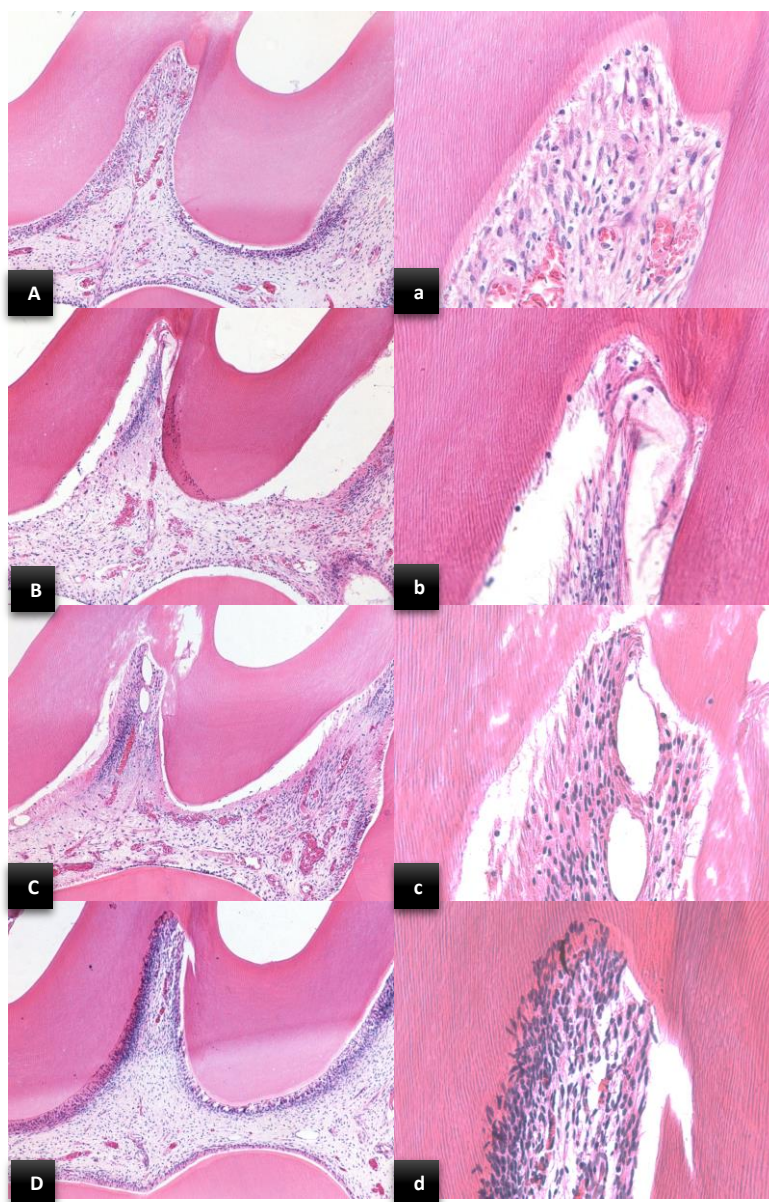


Figura 1. Fotomicrografias representativas dos espécimes dos grupos após 2 dias.

Grupo controle: Aspecto microscópico panorâmico da polpa coronária evidenciando normalidade do tecido pulpar, **(A)**; Corno pulpar evidenciando organização da camada de odontoblastos e ausência de células inflamatórias **(a)**. Grupo CLA: Aspecto microscópico evidenciando desorganização tecidual e áreas inflamação severa **(B)**; Corno pulpar evidenciando necrose do terço oclusal **(b)**. Grupo BS-

CLA: Aspecto microscópico evidenciando infiltrado inflamatório severo e moderado **(C)**; Corno pulpar evidenciando infiltrado inflamatório severo com áreas de necrose **(c)**. Grupo CLA+BS: Aspecto microscópico evidenciando organização tecidual **(D)**; Corno pulpar evidenciando aspecto de normalidade **(d)**. [H.E.; 100x, 400x].

Análise Imunoistoquímica

- **TNF-Alfa:**

Grupo Controle: No terço oclusal, todos os espécimes apresentaram baixo padrão de imunomarcacão para TNF-alfa. No terço médio e cervical a maioria dos espécimes apresentaram, respectivamente, baixo e moderado padrão de imunomarcacão. Este grupo foi usado como parâmetro de comparacão para os demais (Fig.2 – Tab.4).

Grupo CLA: Em todos os terços deste grupo, o padrão de imunomarcacão variou de moderado a extremamente alto para TNF-alfa. No terço oclusal predominou padrão alto e extremamente alto, no terço médio e cervical predominou padrão alto de imunomarcacão para TNF-alfa (Fig.2 – Tab.4).

Grupo BS-CLA: No terço oclusal houve predomínio de padrão baixo de imunomarcacão para TNF-alfa. No terço médio, a maioria dos espécimes apresentaram baixo padrão de imunomarcacão para TNF-alfa, com 3 espécimes apresentando padrão moderado e, apenas 1 apresentou padrão alto. No terço cervical, metade dos espécimes apresentou padrão moderado e a outra metade padrão baixo para imunomarcacão. (Fig.2 – Tab.4).

Grupo CLA+BS: No terço oclusal, médio e cervical houve predomínio de baixo padrão de imunomarcacão para TNF-alfa, com alguns espécimes em exceção que variavam de moderado a extremamente alto padrão de imunomarcacão. (Fig.2 – Tab.4).

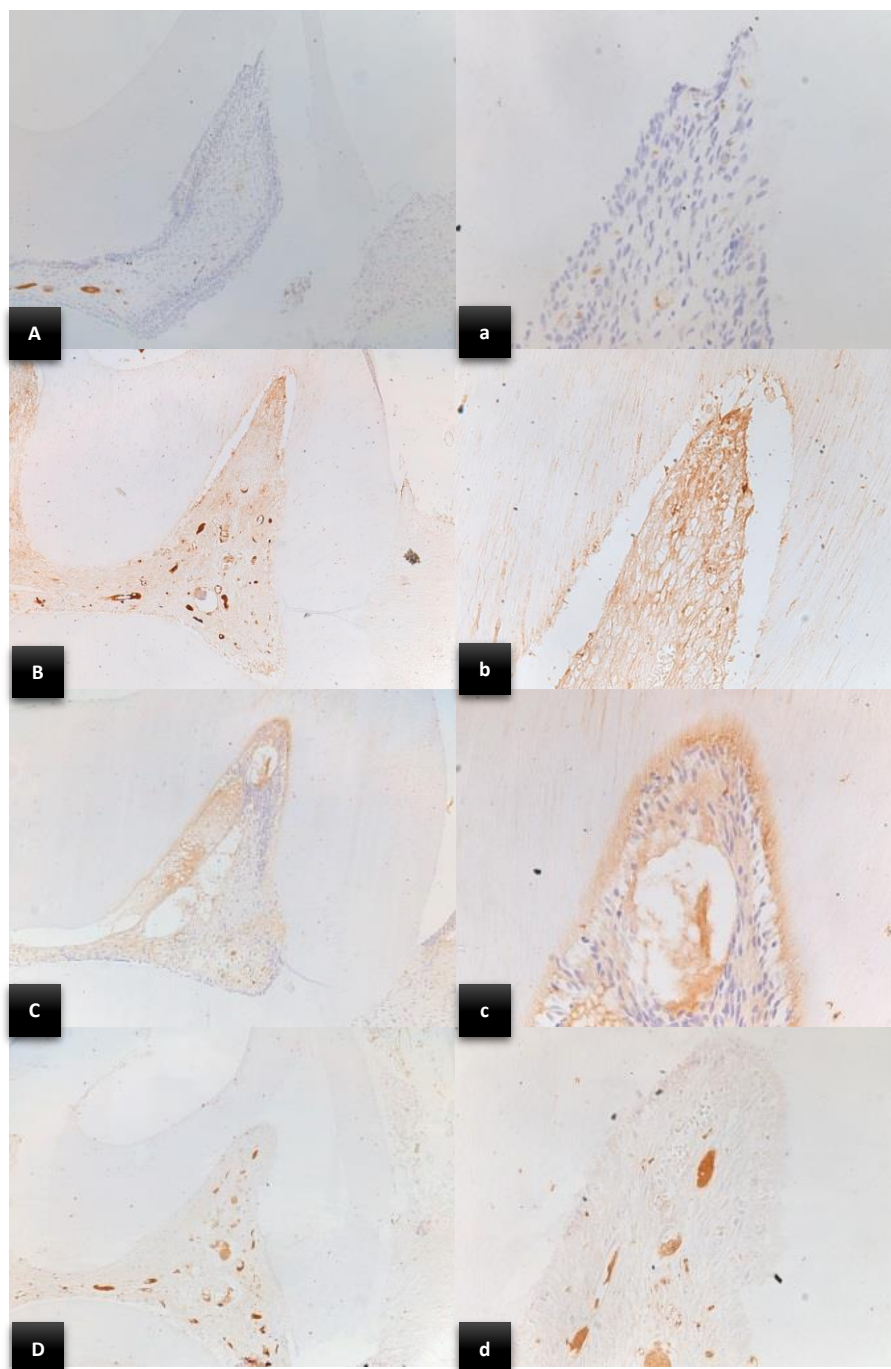


Figura 2. Fotomicrografias representativas dos espécimes dos grupos com imunomarcacão para TNF-alfa. Grupo controle: Aspecto microscópico evidenciando baixo e moderado padrão de imunomarcacão para TNF-alfa **(A)**; Corno pulpar evidenciando baixo padrão de imunomarcacão para TNF-alfa **(a)**. Grupo CLA: Aspecto microscópico evidenciando padrão extremamente alto de imunomarcacão **(B)**; Corno pulpar evidenciando área necrótica **(b)**. Grupo BS-CLA: Aspecto microscópico evidenciando padrão moderado de imunomarcacão para TNF-alfa **(C)**; Corno pulpar evidenciando padrão moderado de imunomarcacão **(c)**. Grupo CLA+BS: Aspecto microscópico evidenciando padrão baixo de imunomarcacão para TNF-alfa **(D)**; Corno pulpar evidenciando padrão baixo de imunomarcacão **(d)**. [TNF-alfa.; 100x, 400x].

Tabela 4. Escores atribuídos para o infiltrado inflamatório e imunomarcação para TNF- α

Análise	Terços	Escore	Grupos				P
			Controle	CLA	BS-CLA	CLA+BS	
H.E	Oclusal	1	10/10	0/10	0/10	2/10	<0,001
		2	0/10	0/10	0/10	4/10	
		3	0/10	0/10	5/10	4/10	
		4	0/10	3/10	5/10	0/10	
		5	0/10	7/10	0/10	0/10	
		Mediana*	1 ^a	5 ^b	3,5 ^{bc}	2 ^{ac}	
	Médio	1	10/10	0/10	0/10	4/10	<0,001
		2	0/10	0/10	5/10	6/10	
		3	0/10	2/10	5/10	0/10	
		4	0/10	6/10	0/10	0/10	
		5	0/10	2/10	0/10	0/10	
		Mediana*	1 ^a	4 ^b	2,5 ^{bc}	2 ^{ac}	
	Cervical	1	10/10	0/10	6/10	7/10	<0,001
		2	0/10	3/10	4/10	3/10	
		3	0/10	6/10	0/10	0/10	
		4	0/10	1/10	0/10	0/10	
		5	0/10	0/10	0/10	0/10	
		Mediana*	1 ^a	3 ^b	1 ^a	1 ^a	
TNF- α	Oclusal	1	0/10	0/10	0/10	0/10	<0,001
		2	10/10	0/10	5/10	6/10	
		3	0/10	2/10	3/10	1/10	
		4	0/10	4/10	2/10	2/10	
		5	0/10	4/10	0/10	1/10	
		Mediana*	2 ^a	4 ^b	2,5 ^{ab}	2 ^{ab}	
	Médio	1	0/10	0/10	0/10	0/10	<0,001
		2	7/10	0/10	6/10	4/10	
		3	3/10	1/10	3/10	2/10	
		4	0/10	5/10	1/10	3/10	
		5	0/10	4/10	0/10	1/10	
		Mediana*	2 ^a	4 ^b	2 ^a	3 ^{ab}	
	Cervical	1	0/10	0/10	0/10	0/10	<0,001
		2	3/10	0/10	5/10	6/10	
		3	7/10	2/10	5/10	1/10	
		4	0/10	6/10	0/10	2/10	
		5	0/10	2/10	0/10	1/10	
		Mediana*	3 ^a	4 ^b	2,5 ^a	2 ^a	

*Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significante entre os grupos ($p < 0.05$).

- **Substância P:**

Grupo Controle: No terço oclusal da polpa coronária houve baixa densidade óptica de imunomarcacão para Substância P, mantendo-se baixo e aproximado nos demais terços da polpa coronária. Este grupo foi usado como parâmetro de comparacão para os demais (Fig.3 – Tab.5).

Grupo CLA: Este grupo apresentou densidade óptica de imunomarcacão para Substância P superior a todos os demais grupos e em todos os terços. À medida que foi se aproximando do nível cervical esse valor foi reduzido, porém se manteve como o mais alto em comparacão aos outros grupos (Fig.3 – Tab.5).

Grupo BS-CLA: A densidade óptica de imunomarcacão para Substância P foi baixa no terço oclusal e semelhante ao controle. No terço médio e cervical foi baixa e inferior ao controle. (Fig.3 – Tab.5).

Grupo CLA+BS: Assim como no grupo BS-CLA, a densidade óptica de imunomarcacão para Substância P foi baixa nos terços oclusal e médio deste grupo, sendo ainda mais reduzida no terço cervical da polpa coronária (Fig.3 – Tab.5).

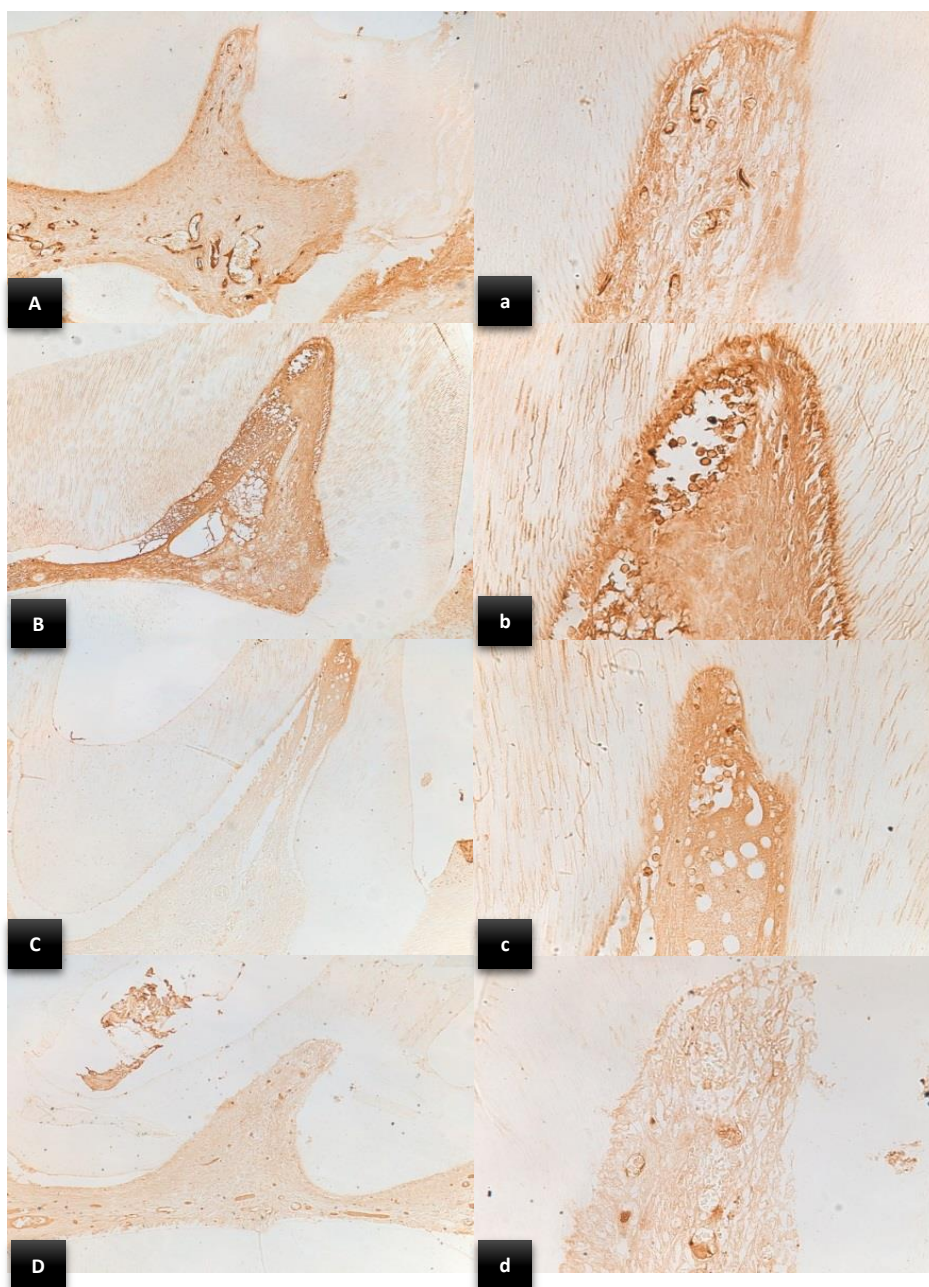


Figura 3. Fotomicrografias representativas dos espécimes dos grupos com imunomarcção para Substância P. Grupo controle: Aspecto microscópico evidenciando baixa densidade óptica de imunomarcção para Substância P em menor (A) e maior (a) aumento Grupo CLA: Aspecto microscópico evidenciando maior densidade óptica de imunomarcção para Substância P (B), (b). Grupo BS-CLA: Aspecto microscópico evidenciando baixa densidade óptica de imunomarcção (C), (c). Grupo CLA+BS: Aspecto microscópico evidenciando baixa densidade óptica de imunomarcção para Substância P (D), (d). [Substância P.; 100x, 400x].

Tabela 5. Densidade óptica de imunomarcção para Substância P

Terços	Grupos				Análise Estatística
	Controle	CLA	BS-CLA	CLA+BS	
Oclusal	4,63 ($\pm 0,72$) ^a	9,52 ($\pm 0,50$) ^b	4,81 ($\pm 0,36$) ^a	4,55 ($\pm 0,68$) ^a	One Way-ANOVA e Tukey: $P = <0,001$
Médio	4,91 ($\pm 0,53$) ^a	8,52 ($\pm 0,57$) ^b	4,17 ($\pm 0,25$) ^c	4,08 ($\pm 0,49$) ^c	One Way-ANOVA e Tukey: $P = <0,001$
Cervical	4,97 ($\pm 0,70$) ^a	6,43 ($\pm 0,45$) ^b	3,69 ($\pm 0,34$) ^c	3,6 ($\pm 0,41$) ^c	One Way-ANOVA e Tukey: $P = <0,001$

*Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p < 0.05$).

- **PCNA:**

Grupo Controle: Este grupo apresentou baixa quantidade de células imunomarcadas para PCNA por mm² em todos os terços da polpa coronária sendo padrão de referência para os demais grupos (Fig.4 – Tab.6).

Grupo CLA: No terço oclusal de todos os espécimes deste grupo não houve possibilidade de contagem de células devido ao processo de necrose, ficando um total de zero células por mm². Já no terço médio, foi o grupo que apresentou maior quantidade de células imunomarcadas para PCNA por mm² e significativamente reduzido no terço cervical da polpa coronária (Fig.4 – Tab.6).

Grupo BS-CLA: No terço oclusal, foi o grupo que teve a maior quantidade de células imunomarcadas para PCNA por mm². A quantidade de células se manteve alta no terço médio, sendo reduzida no terço cervical (Fig.4– Tab.6).

Grupo CLA+BS: Este grupo apresentou uma quantidade moderada de células imunomarcadas por mm² em todos os terços da polpa coronária (Fig.4 – Tab.6).

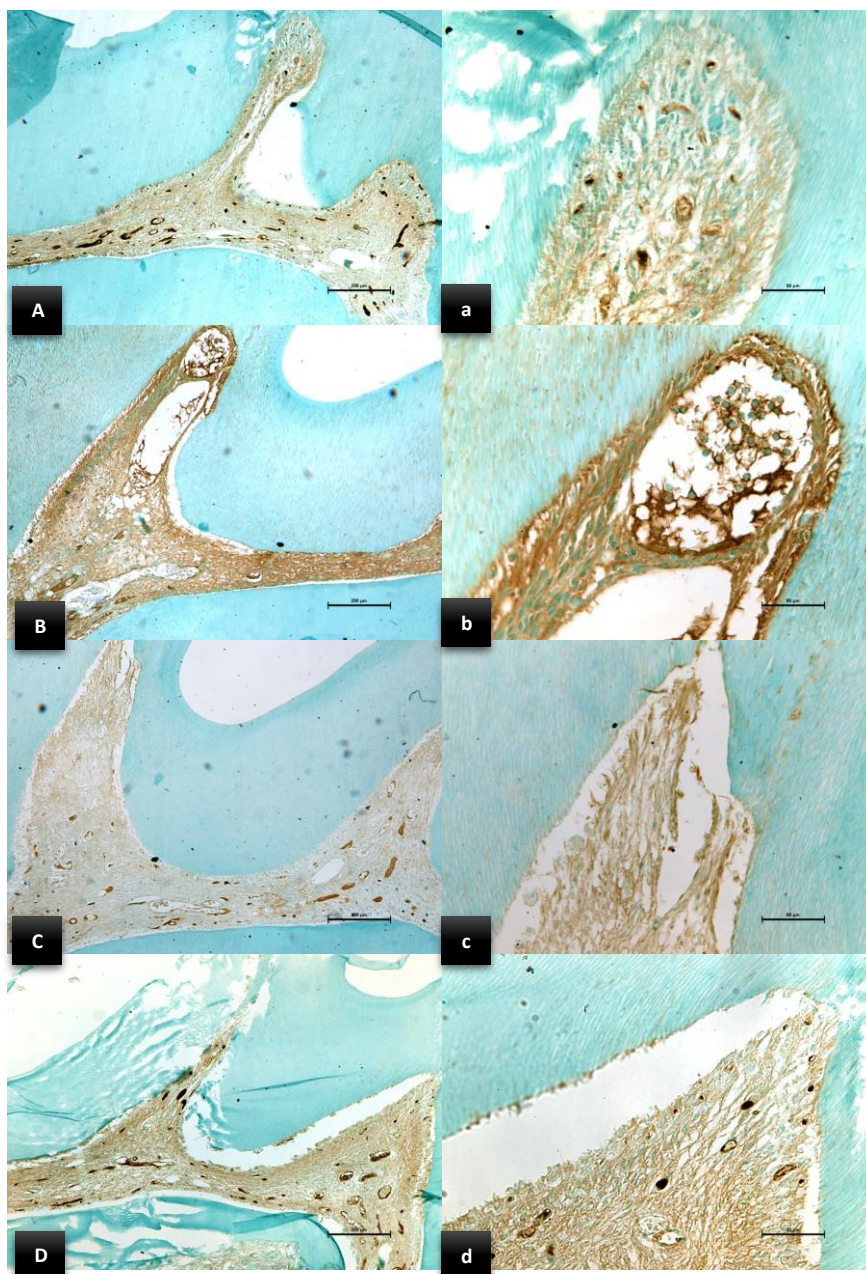


Figura 4. Fotomicrografias representativas dos espécimes dos grupos com imunomarcagem para PCNA. Grupo controle: Aspecto microscópico evidenciando baixa quantidade de células com coloração acastanhada por mm^2 em menor (A) e maior (a) aumento. Grupo CLA: Grande quantidade de células imunomarcadas por mm^2 no terço cervical (B) e área extensa de necrose no terço oclusal (b). Grupo BS-CLA: Grande quantidade de células imunomarcadas por mm^2 em todos os terços da polpa coronária em menor (A) e maior (B) aumento. Grupo CLA+BS: quantidade moderada de células imunomarcadas por mm^2 em todos os terços da polpa coronária (D), (d). [PCNA; 100x, 400x].

Tabela 6. Contagem de células imunomarcadas para PCNA por mm²

Terços	Grupos				Análise Estatística
	Controle	CLA	BS-CLA	CLA+BS	
Oclusal	4,65 (3,46 – 7,69) ^{ab}	0,00 (0,00 – 0,00) ^a	116,48 (92,31 – 253,85) ^c	53,85 (37,50 – 63,46) ^{bc}	Kruskal-Wallis e Dunn: $P = <0,001$
Médio	6,00 (5,00 – 7,00) ^a	155,83 (18,75 – 215,00) ^b	144,29 (75,00 – 181,25) ^b	65,00 (64,37 – 66,25) ^{ab}	Kruskal-Wallis e Dunn: $P = 0,003$
Cervical	15,68 (15,20 – 16,18) ^a	58,82 (35,29 – 63,97) ^b	80,25 (60,78 – 87,75) ^b	41,18 (36,89 – 42,65) ^b	Kruskal-Wallis e Dunn: $P = <0,001$

*Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significante entre os grupos ($p < 0.05$).

- **HO-1:**

Grupo Controle: Este grupo apresentou a menor quantidade de células imunomarcadas para HO-1 por mm² em todos os terços da polpa coronária e serviu de parâmetro de comparação para os demais grupos (Fig.5 – Tab.7).

Grupo CLA: Uma grande quantidade de células imunomarcadas para HO-1 foi encontrada no terço oclusal e médio da polpa coronária, com redução no terço cervical (Fig.5 – Tab.7).

Grupo BS-CLA: A contagem de células imunomarcadas para HO-1 foi alta, porém inferior ao grupo CLA no terço oclusal da polpa coronária. Nos terços médio e cervical houve redução significativa (Fig.5 – Tab.7).

Grupo CLA+BS: Neste grupo a quantidade de células imunomarcadas para HO-1 foi mais baixa que os grupos CLA e BS-CLA no terço oclusal da polpa coronária. No terço médio observou-se semelhança com os grupos CLA e BS-CLA na quantidade de células imunomarcadas para HO-1. No terço cervical observou-se aumento da proliferação celular semelhante ao grupo CLA (Fig.5 – Tab.7).

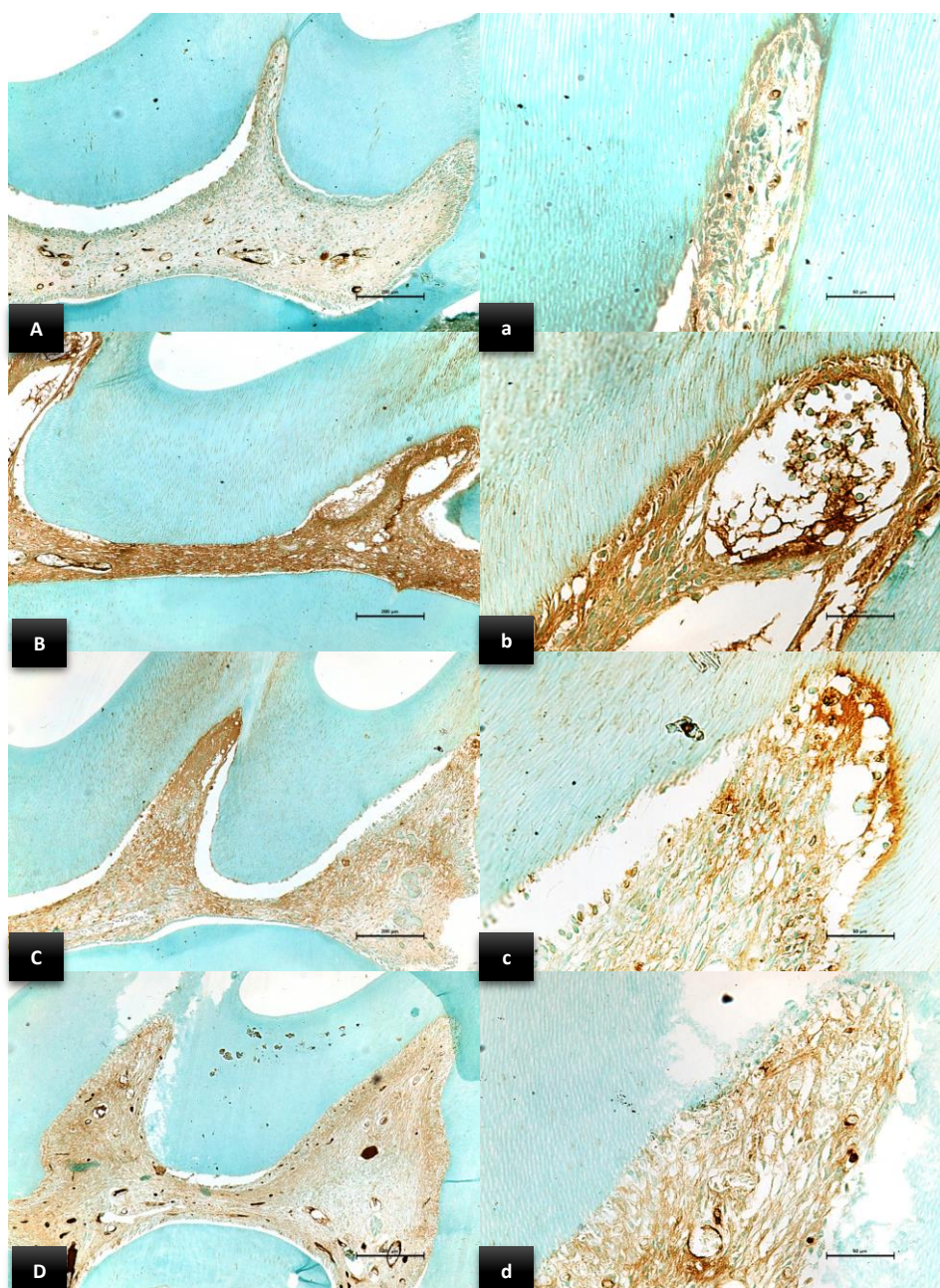


Figura 5. Fotomicrografias representativas dos espécimes dos grupos com imunomarcção para HO-1. Grupo controle: poucas células imunomarcadas para HO-1 por mm² em todos os terços da polpa coronária em menor (A) e maior (a) aumento. Grupo CLA: grande quantidade de células imunomarcadas por mm² (B), (b). Grupo BS-CLA: grande quantidade de células imunomarcadas por mm² no terço oclusal (C) e menor quantidade nos demais terços (c). Grupo CLA+BS: baixa quantidade de células imunomarcadas por mm² em todos os terços da polpa coronária (D), (d). [HO-1; 100x, 400x].

Tabela 7. Contagem de células imunomarcadas para HO-1 por mm²

Terços	Grupos				Análise Estatística
	Controle	CLA	BS-CLA	CLA+BS	
Oclusal	20,51 (±24,05) ^a	143,77 (±59,64) ^b	106,18 (±45,06) ^{bc}	76,08 (±40,90) ^c	One Way – ANOVA e Tukey: P = <0.001
Médio	22,56 (±19,10) ^a	104,37 (±64,39) ^b	57,14 (±38,71) ^{ab}	66,67 (±25,98) ^{ab}	One Way – ANOVA e Tukey: P = 0.002
Cervical	18,06 (±11,76) ^a	63,18 (± 30,54) ^{bc}	48,58 (± 19,03) ^b	90,86 (± 32,40) ^c	One Way – ANOVA e Tukey: P = <0.001

*Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significante entre os grupos ($p < 0.05$).

Comparações entre os grupos

Na análise histológica, os escores atribuídos ao infiltrado inflamatório gerado pelo procedimento clareador foram comparados entre os grupos, e são apresentados na Tabela 4. O grupo CLA apresentou necrose no terço oclusal da polpa coronária, e inflamação severa no terço médio, enquanto o BS-CLA apresentou inflamação severa no terço oclusal e moderada no terço médio, diferentes do Controle ($p < 0,05$). Já CLA+BS apresentou inflamação moderada no terço oclusal e leve no terço médio, sem diferença para o grupo BS-CLA e controle ($p > 0,05$). No terço cervical, havia inflamação leve nos grupos com BS, e moderada no grupo CLA. Na análise comparativa entre os grupos que receberam o gel clareador, pode-se notar uma diferença significativa nos terços oclusal e médio da polpa coronária ($p < 0,05$).

Na análise imunoistoquímica para o imunomarcador TNF-alfa, foi visto que o grupo CLA apresentou padrão extremamente alto de imunomarcagem nos terços oclusal e médio, e padrão severo no terço cervical, sendo diferente do grupo Controle ($p < 0,05$). Enquanto os grupos que receberam a aplicação do BS antes do gel clareador ou na mistura apresentaram baixo padrão de imunomarcagem para

TNF-alfa em todos os terços da polpa coronária, sem diferença com o grupo Controle ($p>0,05$).

A densidade óptica de imunomarcção para Substância P foi alta no grupo CLA, com diferença significativa com o grupo Controle e demais grupos em todos os terços da polpa coronária ($p<0,05$). Os grupos BS-CLA e CLA+BS apresentaram baixa densidade óptica de imunomarcção para Substância P, não havendo diferença com o grupo Controle ($p>0,05$) no terço oclusal, entretanto, no terço médio e cervical esses valores foram ainda reduzidos, diferentes do grupo Controle ($p<0,05$) e semelhantes entre si ($p>0,05$).

Quanto à proliferação celular, o grupo Controle apresentou valores baixos em todos os terços da polpa coronária por não ter sofrido o estresse gerado pelo H_2O_2 , não havendo a necessidade de proliferação de novas células para recuperar o tecido. No terço oclusal, o grupo CLA não apresentou diferença do grupo Controle ($p>0,05$), porém isso ocorreu porque a agressão causada pelo gel clareador foi tão grande que necrosou o terço oclusal da polpa coronária em todos os espécimes do grupo CLA, não havendo mais células para serem contabilizadas. Neste mesmo terço, o grupo BS-CLA apresentou a maior quantidade de células proliferadas, sendo diferente do grupo Controle ($p<0,05$), enquanto o grupo CLA+BS não apresentou diferença entre os grupos Controle e BS-CLA ($p>0,05$). No terço médio, o grupo CLA apresentou a maior imunomarcção para PCNA por ter sofrido uma grande agressão tecidual, necessitando da proliferação celular para se recuperar, sendo este grupo e o BS-CLA diferentes do grupo Controle ($p<0,05$). O grupo CLA+BS não apresentou diferença entre o grupo Controle e demais grupos neste terço da polpa coronária ($p>0,05$). No terço cervical, todos os grupos apresentaram menor proliferação celular por ser uma região de menor agressão, porém os grupos que receberam o gel clareador foram diferentes do grupo controle ($p<0,05$).

Em todos os terços, o grupo CLA+BS apresentou menor imunomarcção para PCNA e o tecido se manteve organizado. Na contagem de células imunomarcadas para HO-1, o grupo Controle apresentou valores baixos em todos os terços por não ter sofrido estresse oxidativo, enquanto os grupos CLA e BS-CLA apresentaram grande quantidade de células imunomarcadas no terço oclusal da polpa coronária, sendo diferentes do grupo Controle ($p<0,05$) e semelhantes entre si ($p>0,05$). O grupo CLA+BS foi semelhante ao grupo BS-CLA ($p>0,05$) e diferente dos demais grupos ($p<0,05$). No terço médio, os grupos BS-CLA e CLA+BS não

apresentaram diferença do grupo CLA e Controle ($p>0,05$) e foram semelhantes entre si ($p>0,05$), contudo, o grupo CLA foi diferente do grupo Controle ($p<0,05$) em todos os terços da polpa coronária. No terço cervical, o grupo CLA+BS foi diferente dos grupos Controle e BS-CLA ($p<0,05$) e semelhante ao grupo CLA ($p>0,05$) que não foi diferente também do grupo BS-CLA ($p>0,05$).

3.7 DISCUSSÃO

Este estudo foi realizado a fim de responder aos questionamentos levantados frente ao modo de ação do Biosilicato® e sua aplicabilidade quando associado ao procedimento clareador. Outros estudos foram realizados com Biosilicato® a fim de identificar o seu protocolo de ação e a partir dos resultados obtidos foi sugerido que o BS aplicado antes ou misturado ao gel clareador pode minimizar os danos causados pelo H_2O_2 .

Diante da confirmação da aplicabilidade do BS na terapêutica dos danos pós-clareação dentária, faz-se necessário compreender o seu mecanismo de ação, com base nas respostas obtidas através dos imunomarcadores escolhidos.

O TNF-alfa já foi utilizado com o objetivo de avaliar o processo inflamatório após clareação dentária associado ao dessensibilizante Otosporin (BENETTI *et al.*, 2018) sendo este considerado um marcador objetivo para determinar a extensão da inflamação pulpar (PEZELJ-RIBARIC *et al.*, 2002, ELSALHY *et al.*, 2013, SHI *et al.*, 2017). A imunomarcagem para o TNF-alfa foi extremamente alta no grupo clareado sem BS, o que reforça a idéia de que o H_2O_2 provoca um processo inflamatório intenso. O baixo padrão de imunomarcagem nos espécimes que receberam a aplicação do BS sugere que este produto inibe o processo inflamatório, evitando que haja sua intensificação, uma vez que o TNF-alfa atua como uma citocina pró-inflamatória (STASHENKO *et al.*, 1987, KOKKAS *et al.*, 2007). Nós observamos que os protocolos de BS usados neste estudo reduziu a imunoexpressão deste marcador como ocorreu com o Otosporin, podendo-se concluir que há uma ação anti-inflamatória do BS, uma vez que foi verificado que o H_2O_2 é capaz de gerar inflamação severa e até necrose do tecido pulpar (FERREIRA *et al.*, 2018).

O vidro bioativo como auxiliar no tratamento da hipersensibilidade dentária já foi discutido em algumas publicações (LEE *et al.*, 2007, TIRAPELLI *et al.*, 2010; 2011, BAKRY *et al.*, 2013, MA *et al.*, 2017). Entretanto, há poucos estudos sobre a atuação deste produto frente à sensibilidade causada pela clareação dentária, principalmente no que diz respeito ao uso de formulações mais potentes e atuais como o Biosilicato® (PINTADO-PALOMINO *et al.*, 2015).

A substância P foi vista em concentrações significativamente maiores em dentes com histórico de sensibilidade dolorosa (AWAWDEH *et al.*, 2002), mas também em maior quantidade no tecido inflamado, por atuar como um mecanismo de defesa em resposta ao traumatismo do tecido pulpar. Sua ação é realizada através da angiogênese que auxilia no processo de reparo (CAVIEDES-BUCHELI *et al.*, 2006; 2007; 2011; 2017, MORIKAWA *et al.*, 2016).

O alto padrão de densidade de imunomarcção para Substância P encontrado no grupo Clareado pode ser justificado pelo fato de que o receptor da substância P (NK1) está expresso na maioria das células inflamatórias (MANTYH *et al.*, 2002, CAVIEDES-BUCHELI *et al.*, 2008) e sugere-se que sua presença é significativamente maior durante fenômenos inflamatórios clínicos (AWAWDEH *et al.*, 1999 , CAVIEDES-BUCHELI *et al.*, 2006 ; 2007), como àquele causado pela clareação dentária já relatado na literatura (GALLINARI *et al.*, 2019) assim como o encontrado nos resultados histológicos deste estudo. A presença dessas células-alvo explica porque nos grupos onde foi aplicado o BS há menor expressão para esse marcador, uma vez que não há tantas células inflamatórias como no grupo Clareado. Como a substância P é um neuropeptídeo relacionado à dor, sua baixa concentração sugere que não há estimulação dolorosa no tecido (WAKISAKA 1990). Este resultado sugere a ação dessensibilizante do BS já indicada em outro estudo (TIRAPELLI *et al.*, 2010).

Outros estudos já correlacionaram o envolvimento entre o antígeno nuclear de proliferação celular e a clareação dentária, concluindo que determinadas concentrações de géis clareadores podem aumentar a atividade proliferativa tanto no tecido gengival quanto no tecido pulpar (DA COSTA FILHO *et al.*, 2002, BENETTI *et al.*, 2017). Este marcador já foi considerado seguro na detecção da atividade proliferativa dos tecidos orais humanos em situações normais e patológicas (CASASCO *et al.*, 1996).

Foi demonstrado que a clareação dentária induz a proliferação celular por uma análise feita sobre o PCNA, devido à agressão ao tecido gerada pelas espécies reativas de oxigênio e a tentativa do tecido se reestabelecer (DA COSTA FILHO *et al.*, 2002, BENETTI *et al.*, 2017). O grupo clareado não apresentou diferença do grupo controle no terço oclusal na contagem de células imunomarcadas por PCNA por ter sido uma região que recebeu a maior agressão, devido a maior proximidade

do H_2O_2 , tornando todo o tecido necrosado. Entretanto, o grupo que recebeu a aplicação prévia do BS, teve uma alta taxa de proliferação celular nessa mesma região, o que indica que o BS foi capaz de reduzir a agressão, evitando a formação de necrose e facilitando o processo de reparo através da proliferação celular. No terço médio, o grupo clareado apresentou a maior taxa de proliferação, por ser uma camada mais profunda do tecido, onde o gel clareador pode penetrar menos e pela ampla necessidade desse tecido restaurar a região mais superficial perdida pelo processo de necrose. O grupo que recebeu o BS na mistura obteve uma menor taxa de proliferação celular, isto indica que o tecido foi menos agredido. Com esses resultados, podemos sugerir que o BS é capaz de reduzir a agressão causada pelo gel clareador e, além disso, auxiliar no processo de reparo acelerando a proliferação celular.

A heme oxigenase-1 (HO-1) desempenha um papel protetor aos tecidos ao estimular a diferenciação celular frente a diferentes tipos de agressão (Kim *et al.*, 2010), inclusive na agressão causada pelo H_2O_2 no tecido pulpar e ligamento periodontal (Pi *et al.*, 2007, Min *et al.*, 2008). O aumento na sua expressão não serve apenas como marcador para quantificar o estresse oxidativo no tecido pulpar, mas também para avaliar a capacidade do tecido se recuperar através da diferenciação odontoblástica e reparo. Os resultados obtidos com o marcador HO-1 foram semelhantes àqueles encontrados com o PCNA. O grupo CLA apresentou a maior quantidade de células imunomarcadas principalmente nos terços mais superficiais da polpa coronária por este ser considerado um marcador de estresse oxidativo. O grupo CLA+BS apresentou uma menor quantidade destas células imunomarcadas em todos os terços da polpa. Isto indica que este grupo recebeu menor estresse e até menor difusão do gel clareador. Entretanto, a alta concentração de células imunomarcadas no terço oclusal da polpa coronária no grupo BS-CLA não significa apenas que houve agressão, mas como já foi relatado na literatura, a HO-1 pode ser uma via de indução da proliferação e diferenciação dos odontoblastos, auxiliando no processo de reparo (KIM *et al.*, 2010). Além disso, essa concentração de células somente no terço oclusal pode indicar que o BS impediu que o dano causado pelo gel clareador expandisse pelos demais terços da polpa coronária.

Assim, o BS aplicado antes ou misturado com o agente clareador apresenta uma terapia promissora para reduzir os danos causados pelo procedimento clareador em dentes vitais.

3.8 CONCLUSÃO

O BS é capaz de reduzir o dano causado pelo gel clareador, diminuindo a inflamação, auxiliando no processo de reparo e atuando como um dessensibilizante.

3.9 REFERÊNCIAS

Anderson, D.G. *et al.* A clinical assessment of the effects of 10% carbamide peroxide gel on human pulp tissue. **J Endod.** v. 25, n. 4, p. 247-250, Apr, 1999.

Awawdeh, L. *et al.* A comparison of four extraction methods for substance P, neurokinin A and calcitonin gene-related peptide from human dental pulp tissue. **Arch Oral Biol.** v. 44, n.12, p. 999-1004, Dec.1999.

Awawdeh, L. *et al.* Quantitative analysis of substance P, neurokinin A and calcitonin gene-related peptide in pulp tissue from painful and healthy human teeth. **Int Endod J.** v. 35, n. 1, p. 30-36, jan. 2002.

Bakry, A.S. *et al.* The durability of phosphoric acid promoted bioglass-dentin interaction layer. **Dent Mater.** v. 29, n. 4, p. 357-364, Apr, 2013..

Benetti, F. *et al.* In Vivo Study of the Action of a Topical Anti-Inflammatory Drug In Rat Teeth Submitted To Dental Bleaching. **Braz Dent J.** v. 29, n. 6, p. 555-561, Nov. 2018.

Benetti, F. *et al.* Hydrogen peroxide induces cell proliferation and apoptosis in pulp of rats after dental bleaching *in vivo*. **Arch Oral Biol.** v. 81, n. 1, p. 81-103, Sep. 2017.

Bistey, T. *et al.* In vitro FT-IR study of the effects of hydrogen peroxide on superficial tooth enamel. **J Dent.** v. 35, n. 1, p. 325-30, 2007.

Casasco, A. *et al.* Localization of proliferating cell nuclear antigen-immunoreactivity in human dental pulp and gingiva. **Bull Group Int Rech Sci Stomatol Odontol.** v. 39, n. 3-4, p. 91-95, Jun.1996.

Caviedes-Bucheli, J. *et al.* The effect of tooth bleaching on substance P expression in human dental pulp. **J Endod.** v.34, n.12, p. 1462-5, Dec. 2008.

Caviedes-Bucheli, J. *et al.* Effect of experimentally induced occlusal trauma on substance p expression in human dental pulp and periodontal ligament. **J Endod.** v. 37, n. 5, p. 627-30, May, 2011.

Caviedes-Bucheli, J. *et al.* Angiogenic mechanisms of human dental pulp and their relationship with substance P expression in response to occlusal trauma. **Int Endod J.** v. 50, n. 4, p. 339-51, Apr, 2017.

Caviedes-Bucheli, J. *et al.* Substance P receptor expression in healthy and inflamed human pulp tissue. **Int Endod J.** v. 40, n. 2, p. 106-11, Feb, 2007.

Caviedes-Bucheli, J. *et al.* Quantification of neuropeptides (calcitonin gene-related peptide, substance P, neurokinin A, neuropeptide Y and vasoactive intestinal polypeptide) expressed in healthy and inflamed human dental pulp. **Int Endod J.** v. 39, n. 5, p. 394-400, May, 2006.

Cintra, L.T.A. *et al.* Evaluation of an experimental rat model for comparative studies of bleaching agents. **J Appl Oral Sci.** v. 24, n. 1, p. 95-104, Feb, 2016b.

Cintra, L.T.A. *et al.* The effect of dental bleaching on pulpal tissue response in a diabetic animal model. **Int Endod J.** v. 50, n. 8, p. 790-8, Oct, 2016c.

Cintra, L.T.A. *et al.* The number of bleaching sessions influences pulp tissue damage in rat teeth. **J Endod** v. 39, n. 12, p. 1576-80, 2013.

Coceska, E. *et al.* Enamel alteration following tooth bleaching and remineralization. **J Microsc.** v. 262, n. 3, p. 232-44, Jun, 2016.

Cooper, K.L.; Liu, K.L.; Hudson, L.G. Contribution of reactive oxygen species and mitogen-activated protein kinase signaling in arsenite-stimulate hemeoxygenase-1 production. **ToxicolApplPharmacol.** v. 218, p. 119-27, 2007.

Costa, C.A.S. *et al.* Human pulp responses to in-office tooth bleaching. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.** v. 109, n. 4, p. 59-64, Apr, 2010.

da Costa Filho, L.C. *et al.* Effect of home bleaching and smoking on marginal gingival epithelium proliferation: a histologic study in women. **J Oral Pathol Med.** V. 31, n. 8, p. 473-80, Sep, 2002.

Deng, M. *et al.* Effects of 45S5 bioglass on surface properties of dental enamel subjected to 35% hydrogen peroxide. **Int J Oral Sci.** v. 5, n. 2, p. 103-10, Jun, 2013.

Elsalhy, M. Azizieh, F. Raghupathy, R. Cytokines as diagnostic markers ofpulpal inflammation. **Int Endod J.** v. 46, p. 573-80, 2013.

Federation Dentaire International. Recommended standard practices for biological evaluation of dental materials: FDI Commission of Dental Materials, Instruments, Equipment and Therapeutics. Part 4.1: subcutaneous implantation test. **Int Dent J.** v. 30, p. 140-88, 1980.

Fernández, E. *et al.* Longevity, Esthetic Perception, and Psychosocial Impact of Teeth Bleaching by Low (6%) Hydrogen Peroxide Concentration for In-office Treatment: A Randomized Clinical Trial. **Oper Dent.** v. 42, n. 1, p. 41-52, Aug, 2016.

Ferreira, L.L. *et al.* The effect of dental bleaching on pulpal tissue response in a diabetic animal model: a study of immunoregulatory cytokines. **Int Endod J.** v. 51, n. 3, p. 347-56, Mar, 2018.

Gallinari, M.O. *et al.* Pulp response of rats submitted to bleaching and the use of different anti-inflammatory drugs. **PLoS One.** v. 14, n. 1, p. 210-339, Jan, 2019.

Haywood, V.B. Treating sensitivity during tooth whitening. **Compend Contin Educ Dent.** v. 26, p. 11-20, Sep, 2005.

Kim, S.J. *et al.* The role of heme oxygenase-1 in the proliferation and odontoblastic differentiation of human dental pulp cells. **J Endod.** v. 36, n. 8, p. 1326-31, Aug, 2010.

Kina, J.F. *et al.* Response of human pulps after professionally applied vital tooth bleaching. **Int Endod J.** v. 43, n. 7, p. 572-80, Jul, 2010.

King, T.W. *et al.* Quantification of vascular density using a semiautomated technique for immunostained specimens. **Anal. Quant. Cytol. Histol.** v. 24, p. 39-48, 2002.

Kokkas, A.B. *et al.* Irreversible but not reversible pulpitis is associated with up-regulation of tumour necrosis factor-alpha gene expression in human pulp. **Int Endod J.** v. 40, n. 3, p. 198-203, Mar, 2007.

Kraigher A. *et al.* Caries occurrence in rats after bleaching with 10% carbamide peroxide in vivo. **Caries Res.** v. 40, n. 1, p. 77-80, 2006.

Lee, B.S. et al. In vitro study of dentinal tubule occlusion with sol-gel DP-bioglass for treatment of dentin hypersensitivity. **Dent Mater J.** v. 26, n. 1, p. 52-61, Jan. 2007 Jan.

Li, J.G. et al. Melatonin attenuates inflammation of acute pulpitis subjected to dental pulp injury. **Am J Transl Res.** v. 15, n. 7, p. 68-78, 2015.

Ma, Q. et al. Comparison of in vitro dentinal tubule occluding efficacy of two different methods using a nano-scaled bioactive glass-containing desensitising agent. **J Dent.** v. 60, n. 1, p. 63-9, May. 2017.

Mantyh, P.W. Neurobiology of substance P and the NK1 receptor. **J Clin Psychiatry.** v. 63, n. 1, p. 6-10, 2002.

Meireles, S.S. et al. Changes in oral health related quality of life after dental bleaching in a double-blind randomized clinical trial. **J Dent.** v. 42, n. 2, p. 114-21, Feb. 2014.

Min, K.S. et al. Hydrogen peroxide induces heme oxygenase-1 and dentin sialophosphoprotein mRNA in human pulp cells. **J Endod.** v. 34, n. 8, p. 983-9, Aug. 2008.

Morikawa, T. et al. Dental pulp cells promote the expression of receptor activator of nuclear factor- κ B ligand, prostaglandin E2 and substance P in mechanically stressed periodontal ligament cells. **Arch Oral Biol.** v. 70, n. 1, p. 158-64, Oct. 2016.

Otterbein, L.E.; Choi, A.E. Hemeoxygenase: colors of defense against cellular stress. **Am J Physiol Lung Cell MolPhysiol.** v.179, n. 1, p. 1029-37, 2000.

Pae, H.O.; Chung, H.T. Heme oxygenase-1: its therapeutic roles in inflammatory diseases. **Immune Netw.** v.9, n. 1, p. 12-9, Feb, 2009.

Pezelj-Ribaric, S. et al. Detection of tumor necrosis factor alpha in normal and inflamed human dental pulps. **Arch Med Res.** v. 33, n. 5, p. 482-4, Sep. 2002.

Pi, S.H. et al. Defense mechanism of heme oxygenase-1 against cytotoxic and receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand inducing effects of hydrogen peroxide in human periodontal ligament cells. **J Periodontal Res.** v. 42, n. 4, p. 331-9, Aug. 2007.

Pintado-Palomino, K. et al. clinical, randomized, controlled study on the use of desensitizing agents during tooth bleaching. **J Dent.** v. 43, n. 9, p. 1099-105, Sep. 2015.

Roderjan, D.A. et al. Response of human pulps to different in-office bleaching techniques: preliminary findings. **Braz Dent J.** v. 26, n. 3, p. 242-8, May. 2015.

Shi, L. et al. TNF-alpha stimulation increases dental pulp stem cell migration in vitro through integrin alpha-6 subunit upregulation. **Arch Oral Biol.** v. 75, n. 1, p. 48-54, Mar. 2017.

Stashenko, P. et al. Synergistic interactions between interleukin 1, tumor necrosis factor, and lymphotoxin in bone resorption. **J Immunol.** v. 138, n. 5, p. 1464-8, Mar. 1987.

Tansey, M.G.; Szymkowski, D.E. The TNF superfamily in 2009: new pathways, new indications, and new drugs. **Drug Disc Today.** v. 14, n. 23-24, p. 1082-8, 2009.

Tirapelli, C. et al. The effect of a novel crystallised bioactive glass-ceramic powder on dentine hypersensitivity: a long-term clinical study. **J Oral Rehabil.** v. 38, n. 4, p. 253-62, Apr. 2011.

Tirapelli, C. et al. A novel bioactive glass-ceramic for treating dentin hypersensitivity. **Braz Oral Res.** v. 24, n. 4, p. 381-7, Oct. 2010.

Wakisaka S. Neuropeptides in the dental pulp: distribution, origins, and correlation. **J Endod.** v. 16, n. 2, p. 67-9, Feb.1990.

ANEXO – COMITÊ DE ÉTICA



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 do potencial terapêutico de um gel de Biosilicato® frente ao estresse oxidativo do tecido pulpar decorrente de procedimento clareador e de sua influência na penetração do peróxido de hidrogênio e na eficácia clareadora. Estudo in vivo e in vitro"**, Processo FOA nº 00229-2017, 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 17 de Maio de 2017.

VALIDADE DESTE CERTIFICADO: 16 de Abril de 2019.

DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 16 de Maio de 2019.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled **"Therapeutic potencial evaluation of Biosilicate® gel against the oxidative stress of the pulp tissue due to dental bleaching and its influence on the penetration capacity of hydrogen peroxide and bleaching efficiency. In vivo and in vitro study"**, Protocol FOA nº 00229-2017, 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 May 17, 2017.

VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: April 16, 2019.

DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: May 16, 2019.

Prof. Ass. Dr. Leonardo Perez Faverani
Coordenador da CEUA
CEUA 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