

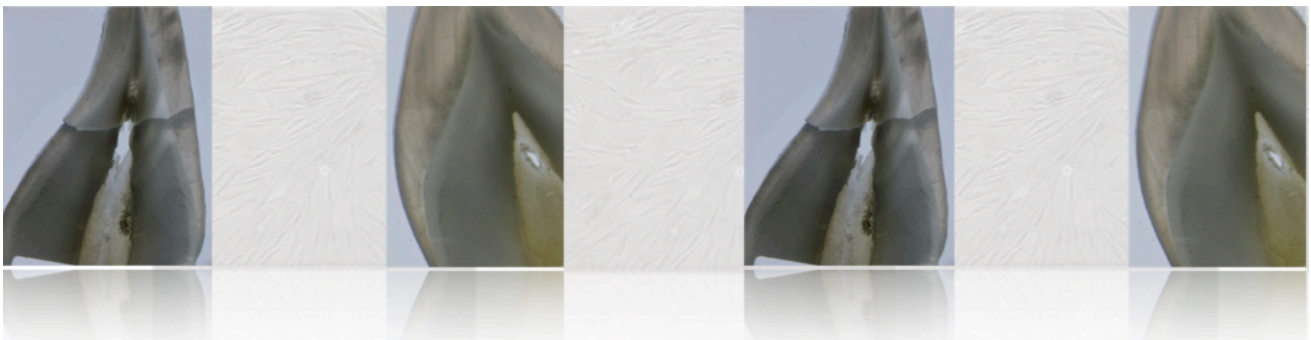


**UNESP - Universidade Estadual Paulista**  
**“Júlio de Mesquita Filho”**  
**Faculdade de Odontologia de Araraquara**



**CARLA CAROLINE DE OLIVEIRA DUQUE**

**INFLUÊNCIA DA ESPESSURA DO SUBSTRATO DENTAL SOBRE A  
EFICÁCIA CLAREADORA E CITOTOXICIDADE DE DIFERENTES  
PROTOCOLOS DE CLAREAMENTO**



Araraquara

2016



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



**CARLA CAROLINE DE OLIVEIRA DUQUE**

**INFLUÊNCIA DA ESPESSURA DO SUBSTRATO DENTAL SOBRE A EFICÁCIA  
CLAREADORA E CITOTOXICIDADE DE DIFERENTES PROTOCOLOS DE  
CLAREAMENTO**

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

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto de Souza Costa

Co-orientadora: Profa. Dra. Diana Gabriela de Sousa Soares

Araraquara

2016

Duque, Carla Caroline de Oliveira

Influência da espessura do substrato dental sobre a eficácia clareadora e citotoxicidade de diferentes protocolos de clareamento / Carla Caroline de Oliveira Duque.-- Araraquara: [s.n.], 2016.  
63 f. ; 30 cm.

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

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto de Souza Costa

Co-orientadora: Profa. Dra. Diana Gabriela de Sousa Soares

1. Citotoxicidade      2. Clareamento dental      3. Polpa dentária  
I. Título

**CARLA CAROLINE DE OLIVEIRA DUQUE**

**INFLUÊNCIA DA ESPESSURA DO SUBSTRATO DENTAL SOBRE A  
EFICÁCIA CLAREADORA E CITOTOXICIDADE DE DIFERENTES  
PROTOCOLOS DE CLAREAMENTO**

Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Comissão Julgadora

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

2º Examinador: Prof. Dr. André Luís Fraga Briso

3º Examinador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Fernanda Gonçalves Basso

Araraquara, 23 de Março de 2016

## DADOS CURRICULARES

### CARLA CAROLINE DE OLIVEIRA DUQUE

NASCIMENTO	01.07.1988
FILIAÇÃO	Carlos Alberto Duque Onelice Pereira de Oliveira
2009-2013	Graduação em Odontologia pela Faculdade de Odontologia de Araraquara -UNESP
2012-2013	Estágio de Capacitação em Prótese Fixa pela Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP
2013-2015	Estágio de Docência em Prótese Fixa pela Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP Estágio de Docência em Patologia Bucal pela Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP
2014-2016	Pós Graduação – Mestrado em Reabilitação Oral – Área de concentração: Prótese.

## *Dedicatória*

*Ao meu mestre e guia maior,*

*Deus:*

Primeiramente dedico a Deus todo fruto desde trabalho e todas as bênçãos e excelentes oportunidades colocadas em minha vida. Sem Ele nada seria possível de ser concretizado. Agradeço a Deus por todo crescimento espiritual e intelectual. Deus, muito obrigada por tudo. Amo muito o Senhor!

*Aos meus pais, Carlos e Onelice*

Aos meus pais, que são minhas raízes, agradeço por todas as oportunidades e pelos ensinamentos proporcionados. Sem vocês nada disso seria possível. Amo muito vocês!

*Ao meu melhor amigo, meu irmão Vinicius*

Agradeço a oportunidade que Deus nos deu de além de sermos irmãos, sermos melhores amigos. Você é meu alicerce e meu braço direito, minha admiração pela sua grandiosidade infinita. Te amo muito!

*Ao meu amor, meu noivo, Matheus*

Obrigada por tudo que você tem feito por mim, por toda a paciência, encorajamento, amor e cuidado. Muito obrigada por fazer dos meus sonhos, os nossos sonhos, e também por me ajudar a realizá-los. Te amo demais!

*À minha avó Maria,*

À minha avó **Maria** (*in memoriam*), por todo cuidado, por todo amor e carinho que sempre teve comigo, por ser minha estrela guia. Por você, amor eterno.

*À minha co-orientadora e amiga, Diana,*

Di, tem sido uma honra trabalhar contigo. Você me ensinou a trabalhar com muito capricho, alegria e retidão. Eu tenho uma imensa admiração pessoal e profissional pela sua pessoa. Muito obrigada por tudo!

## *Agradecimentos Especiais*

Ao **Prof. Dr. Carlos Alberto de Souza Costa**, por ter aberto as portas do Laboratório de Patologia Experimental e Biomateriais, do Departamento de Fisiologia e Patologia da FOAr-UNESP, para que eu pudesse trabalhar no desenvolvimento deste e de outros projetos de pesquisa, desde minha Iniciação Científica, o que me trouxe imenso crescimento pessoal e profissional através de lições valiosas. Muito obrigada!

À **Profa. Dra. Josimeri Hebling**, que contribuiu de maneira muito significativa para toda a realização deste trabalho através de seu conhecimento e suas ideias, as quais foram transmitidas com todo carisma e carinho. Muito obrigada!

Agradeço imensamente à **Profa. Dra. Fernanda Gonçalves Basso**, que como Co-coordenadora do Laboratório de Patologia Experimental e Biomateriais, do Departamento de Fisiologia e Patologia da FOAr-UNESP, contribuiu de maneira bastante significativa para que a realização deste trabalho fosse possível.

Às colegas de laboratório, **Juliana, Maria Luíza, Suelen, Claudia, Larissa e Cristiane**, por todos os momentos vividos, pelas conversas e pela ajuda em algum momento no desenvolvimento deste trabalho. Obrigada meninas pela convivência e por todo aprendizado neste período.

Às alunas de Iniciação Científica **Natália e Fernanda** com quem tiver oportunidade de trabalhar junto, auxiliando em seus projetos. Meninas, muito obrigada pela convivência e pelo crescimento proporcionado.

Aos amigos de Mestrado em Reabilitação Oral, do Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese, da FOAr-UNESP, **Ju Alonso, Larissa e Lucas** pela

convivência no estágio de docência, também pelas conversas e risadas. A companhia de vocês foi fundamental neste período e trouxe muita leveza ao dia a dia.

À família **Oliveira Duque**, com todos os tios(as), primos(as) que sempre foram meu alicerce e meu motivo para persistir, especialmente a minha avó **Amélia** e as minhas tias **Cida, Dora e Maria** que sempre cuidaram muito de mim com um amor incondicional. Vocês foram e são essenciais em todas as minhas conquistas. Amo muito vocês!

À minha querida amiga **Gabriele** com quem pude compartilhar inúmeros momentos da vida desde a época do colégio. Obrigada pela amizade e por todo carinho. Amo muito você!

Às amigas de graduação, **Jéssica, Daphine e Laís**, por estarem presentes sempre e por toda amizade. Amo vocês, meninas!

À família **Fagá, a Dona Eva, Sr. Laerte, Rafael e Mari**, por terem me acolhido e por se tornarem a minha segunda família aqui em Araraquara. Muito obrigada por tudo! Amo vocês!

## *Agradecimentos*

À **Faculdade de Odontologia de Araraquara (FOAr-UNESP)**, representada pelas Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Andréia Affonso Barreto Montandon e vice-diretora Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Elaine Maria Sgavioli Massucato, que através de todos os seus professores, funcionários e alunos que foram fundamentais em minha formação profissional e pessoal tanto no período de Graduação quanto de Pós-Graduação.

Ao **Laboratório de Patologia Experimental e Biomateriais da FOAr-UNESP**, do Departamento de Fisiologia e Patologia, representado pelo seu coordenador Prof. Dr. Carlos Alberto de Souza Costa, onde esta pesquisa foi realizada.

Ao **Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese da FOAr-UNESP**. A todos os professores e funcionários, agradeço pela disponibilidade, presteza e respeito que sempre tiveram comigo. Muito obrigada por tudo!

Ao **Programa de Pós-Graduação em Reabilitação Oral, do Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese da FOAr-UNESP**, representado pela coordenadora Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Ana Claudia Pavarina e vice-coordenadora Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Renata Garcia Fonseca, por toda acessibilidade durante este período.

À **Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Lígia Antunes Pereira Pinelli**, por ter aberto as portas tanto na Graduação quanto na Pós-Graduação, através dos estágios realizados na disciplina de Prótese Fixa, do Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese, da FOAr-UNESP. Muito obrigada por todos os ensinamentos!

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES**, pela bolsa de mestrado concedida no período de abril/2014 a junho/2014.

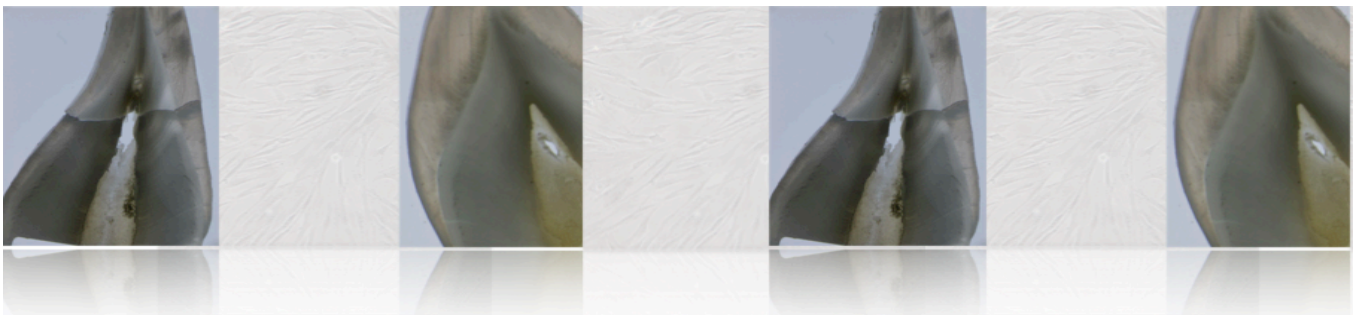
À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP**, pela bolsa de mestrado concedida no período de julho/2014 a março/2016 (processo: 2014/07229-6)

Ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq**, pelo auxílio à pesquisa (Chamada Universal Processo: 442336/2014-4) concedido com o projeto de pesquisa referente à esta Dissertação de Mestrado.

À **Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica – SBPqO**, pela concessão do prêmio de incentivo à pesquisa PRONAC, para financiamento desta pesquisa.

*“Afinal, há de que ter paciência, dar tempo ao tempo. Já devíamos ter aprendido, e de uma vez para sempre, que o destino tem de fazer muitos rodeios para chegar em qualquer parte.”*

*Guimarães Rosa*



Duque CCO. Influência da espessura do substrato dental sobre a eficácia clareadora e citotoxicidade de diferentes protocolos de clareamento [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2016.

## RESUMO

Tem sido demonstrado que a susceptibilidade do complexo dentino-pulpar aos efeitos adversos do clareamento dental apresenta uma relação direta com a espessura de esmalte/dentina do substrato dental. Desta forma, o objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito estético e biológico de um gel clareador contendo 10% de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) aplicado por diferentes períodos sobre a superfície de discos simulando a espessura de incisivos inferiores (ICI) e pré-molares superiores (PMS). Discos de esmalte/dentina, provenientes de incisivos bovinos, com 2,3 e 4,0 mm de espessura foram adaptados a câmaras pulpares artificiais e distribuídos nos Grupos ICI e PMS, respectivamente. O gel clareador com 10% de  $H_2O_2$  foi aplicado na superfície de esmalte por 3x15, 1x15 ou 1x5 minutos. Como controle positivo, um gel com 35% de  $H_2O_2$  aplicado por 3x15 minutos (protocolo tradicional) foi empregado. Nenhum tratamento foi realizado na superfície de esmalte no grupo controle negativo. O meio de cultura em contato com a dentina imediatamente após o clareamento (extrato) foi coletado e aplicado por 1 hora sobre células pulpares humanas. A viabilidade e morfologia celular foram avaliados imediatamente após exposição aos extratos (T1), bem como 72 horas pós-tratamento (T2). O estresse oxidativo e a quantificação do  $H_2O_2$  nos extratos também foram analisados em T1. A atividade de ALP (atividade de fosfatase alcalina) e deposição de nódulos de mineralização (NM) foram avaliados em períodos de 14 e 21 dias pós-clareamento, respectivamente. De forma a avaliar a eficácia estética dos protocolos testados nas diferentes condições experimentais, mensurou-se ainda a alteração de cor ( $\Delta E$ ) durante seis sessões clareadoras. De uma forma geral, observou-se que todos os protocolos experimentais com gel a 10% de  $H_2O_2$  promoveram diminuição dos efeitos deletérios promovidos pelo protocolo

tradicional. O protocolo 10% 3x15 causou redução significativa na viabilidade celular em relação ao controle negativo no período T1, em ambos os Grupos ICI e PMS, sendo que as células expostas a este protocolo no Grupo ICI não demonstraram capacidade proliferativa em T2. As alterações morfológicas, a intensidade do estresse oxidativo e a redução nos marcadores fenotípicos (ALP e NM) também foram mais intensos para este protocolo nos Grupos ICI e PMS. Para os protocolos 10% 1x15 ou 1x5 minutos, ausência de redução significativa na viabilidade celular foi observada, independente da espessura. No entanto, estresse oxidativo significativo foi observado nas células do Grupo ICI. Estes protocolos promoveram redução na atividade de ALP, a qual foi proporcional ao tempo de contato e espessura do substrato dental; entretanto não se observou redução na deposição de NM aos 21 dias. Valores de  $\Delta E$  similares ao protocolo tradicional foram observados para os protocolos 10% 3x15 e 10% 1x15 no Grupo ICI após 4 e 6 sessões, respectivamente. Para o Grupo PMS, este parâmetro foi atingido apenas para o protocolo 10% 3x15 após 6 sessões clareadoras. Concluiu-se que a espessura do substrato dental influenciou significativamente na citotoxicidade trans-amelodentinária do gel com 10% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. A aplicação deste gel por períodos de 45 ou 15 minutos sobre discos simulando a espessura de incisivos inferiores minimizou significativamente a toxicidade celular e promoveu clareamento tão efetivo quanto o protocolo tradicionalmente empregado.

**Palavras-chave:** Citotoxicidade. Clareamento dental. Polpa dental

Duque CCO. Influence of enamel and dentin thicknesses on the esthetic outcome and cytotoxicity of different tooth bleaching protocols [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2016.

## **ABSTRACT**

The susceptibility of pulp-dentin complex to the adverse effects of tooth bleaching therapies has a direct relationship with the thickness of dental substrate. Therefore, the aim of this study was to assess the biologic and esthetic effect of a 10% hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) bleaching gel applied for different periods onto enamel/dentin discs simulating the thickness of low incisors (LI) and upper premolars (PM). Enamel/dentin discs from bovine incisors measuring 2.3 and 4.0 mm were adapted to artificial pulp chambers and distributed into the IC Group (low incisors) and PM Group (upper premolars), respectively. The enamel surface was bleached with a 10%  $H_2O_2$  gel for 3x15, 1x15 or 1x5 minutes. The 35%  $H_2O_2$  gel applied for 3x15 minutes was used as positive control (traditional therapy) and no treatment was performed on negative control group. The culture medium immediately after bleaching (extract) was applied for 1 hour on human dental pulp cells. Cell viability and morphology were evaluated immediately after bleaching (T1) and 72 h thereafter (T2). Oxidative stress and the amount of  $H_2O_2$  in culture medium were also quantified at T1. The ALP activity and mineralized nodule (MN) deposition were assessed 14 and 21 days after bleaching, respectively. The color change ( $\Delta E$ ) of enamel was analyzed throughout six bleaching sessions. Overall, the experimental protocols with the 10%  $H_2O_2$  gel minimized significantly the negative effects of traditional therapy to cultured pulp cells. The protocol 10% 3x15 promoted significant cell viability reduction in comparison with negative control at T1, in both, IC and PM Groups; however, the cells of IC Group did not feature proliferative capability at T2. The morphologic alterations, oxidative stress intensity and reduction on phenotype markers (ALP and NM) expression were also more intense on IC Group for this bleaching protocol. Regarding the protocols 10% 1x15 and 1x5, no significant cell

viability reduction related to negative control was observed regardless of the thickness of dental substrate. Nevertheless, significant oxidative stress was observed on cells from IC Group. These protocols caused significant reduction of ALP activity in comparison to negative control, which intensity being proportional to enamel/dentin thickness; however, no reduction on NM was detected at 21 days post-bleaching. Similar  $\Delta E$  values as positive control were found for the 10% 3x15 and 1x15 protocol on IC Group after 4 and 6 sessions, respectively. For PM Group, this feature was reached out after 6 bleaching sessions for the 10% 3x15 protocol. It was concluded that the enamel/dentin thickness of dental substrate played a significant role on the trans-enamel and trans-dentinal cytotoxicity of a 10% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bleaching gel on human dental pulp cells in vitro. Application of gel during 45 or 15 minutes onto thin dental substrate minimizes significantly the cell toxicity in comparison to high concentrated gels (35%) associated with similar esthetic outcome by increasing the number of bleaching sessions.

**Key-words:** Cytotoxicity. Tooth-bleaching. Dental pulp.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	18
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA</b>	20
<b>3 PROPOSIÇÃO</b>	26
<b>3.1 Objetivos Específicos</b>	26
<b>4 MATERIAL E MÉTODO</b>	27
<b>4.1 Determinação da Espessura de Esmalte/Dentina dos Discos</b>	27
<b>4.2 Obtenção dos Discos de Esmalte/Dentina</b>	30
<b>4.3 Protocolos de Clareamento</b>	31
<b>4.4 Avaliação da Citotoxicidade Trans-Amelodentinária</b>	32
<b>4.5 Avaliação da Eficácia Clareadora</b>	37
<b>4.6 Análise Estatística</b>	40
<b>5 RESULTADO</b>	41
<b>5.1 Viabilidade Celular</b>	41
<b>5.2 Morfologia Celular</b>	43
<b>5.3 Estresse Oxidativo</b>	45
<b>5.4 Atividade de ALP/Nódulos de Mineralização</b>	46
<b>5.5 Quantificação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nos Extratos</b>	48
<b>5.6 Alteração de Cor</b>	49
<b>6 DISCUSSÃO</b>	51
<b>7 CONCLUSÃO</b>	57

<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>58</b>
<b>ANEXO .....</b>	<b>63</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O desencadeamento do quadro de hipersensibilidade dental durante e após a realização do clareamento dental é amplamente descrito na literatura, sendo este efeito mais severo em pacientes submetidos à técnica clareadora de consultório (Reis et al.<sup>40</sup>, 2011; Reis et al.<sup>41</sup>, 2011; Kossatz et al.<sup>27</sup>, 2011; de Almeida et al.<sup>16</sup>, 2012; Tay et al.<sup>62</sup>, 2012; Martin et al.<sup>33</sup>, 2013; de Paula et al.<sup>19</sup>, 2015). O peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) proveniente de géis clareadores apresenta a propriedade de se difundir pela estrutura dental e atingir a câmara pulpar. Uma vez em contato com o tecido pulpar, esta espécie reativa de oxigênio, é capaz de atravessar membranas celulares, sendo dissociado em radicais livres no citoplasma, o que resulta no estabelecimento do estado de estresse oxidativo (Ceçarini et al.<sup>11</sup>, 2007; Soares et al.<sup>55</sup>, 2015). Estudos histopatológicos demonstraram o desencadeamento de resposta inflamatória aguda no tecido pulpar de dentes humanos e de animais como consequência deste processo (De Souza Costa et al.<sup>20</sup>, 2010; Cintra et al.<sup>12</sup>, 2013; Roderjan et al.<sup>42</sup>, 2014; Roderjan et al.<sup>43</sup>, 2015).

Esses efeitos biológicos são diretamente proporcionais à concentração de  $H_2O_2$  capaz de se difundir pela estrutura dental e interagir com as células pulpares (Soares et al.<sup>49</sup>, 2013; Duque et al.<sup>22</sup>, 2014; Soares et al.<sup>50</sup>, 2014; Soares et al.<sup>52</sup>, 2015; Soares et al.<sup>53</sup>, 2015). Assim, a redução na concentração de  $H_2O_2$  nos agentes clareadores, bem como no tempo de contato com a estrutura dental têm sido alvo de diversas pesquisas na atualidade, visando a determinação de um protocolo de clareamento seguro do ponto de vista biológico. Estudos recentes demonstraram que o emprego de um gel com 17,5% de  $H_2O_2$  promoveu redução significativa da citotoxicidade trans-amelodentinária do clareamento dental sobre células de origem pulpar, quando comparado ao gel com 35% de  $H_2O_2$  (Soares et al.<sup>50</sup>, 2014). No entanto, este efeito deletério não foi completamente eliminado, especialmente para as células pulpares obtidas a partir de dentes humanos, visto que as mesmas apresentaram elevada sensibilidade ao estresse oxidativo promovido pelo  $H_2O_2$ . Estes protocolos também resultaram em intensa expressão gênica de mediadores pró-inflamatórios e redução na expressão de marcadores de diferenciação odontoblástica, demonstrando que um quadro de estresse oxidativo patológico foi estabelecido (Soares et al.<sup>55</sup>, 2015). Outros estudos demonstraram

que o emprego de géis com 10 e 8% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi promissor na minimização do efeito tóxico trans-amelodentinário sobre as células pulpares humanas (Soares et al.<sup>53</sup>, 2015). Entretanto, a redução na eficácia clareadora, em curto prazo, ainda permanece como o principal ponto negativo para estes protocolos alternativos (Soares et al.<sup>50</sup>, 2014).

Em contrapartida, estudos clínicos recentes têm demonstrado que a prevalência e intensidade da sensibilidade dental estão diretamente relacionadas ao grupo de dentes submetidos ao clareamento. Assim, os incisivos têm sido considerados como os dentes mais susceptíveis ao desencadeamento deste efeito adverso, independente da técnica clareadora empregada (De Almeida et al.<sup>16</sup>, 2012; Bonafé et al.<sup>3</sup>, 2013; Bonafé et al.<sup>4</sup>, 2014). Estes dados são corroborados pelo estudo histopatológico realizado por De Souza Costa et al.<sup>20</sup> (2010), onde ausência de alterações no tecido pulpar dos pré-molares foi observada quando um gel com 38% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi aplicado por 3x 10 minutos sobre a estrutura dental, enquanto que necrose de coagulação associada à intensa reação inflamatória no tecido subjacente foi observada em incisivos inferiores. De forma similar, Roderjan et al.<sup>42</sup> (2014) observaram que a intensidade dos efeitos adversos no tecido pulpar de incisivos humanos, bem como na capacidade de reparo, apresentou relação direta com a espessura de dentina dos dentes submetidos ao clareamento.

Como a eficácia do clareamento é relacionada à oxidação dos cromóforos presentes na dentina, surge a hipótese de que dentes pequenos podem ser mais facilmente clareados, sem a necessidade do emprego de protocolos agressivos. Assim, protocolos clareadores mais biocompatíveis poderiam ser direcionados aos dentes com menor espessura de esmalte/dentina sem prejuízos estéticos. Desta forma, o presente projeto de pesquisa buscou avaliar o efeito da espessura de esmalte/dentina do substrato dental sobre parâmetros biológicos e estéticos de um gel clareador experimental contendo 10% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, aplicado por diferentes períodos sobre a estrutura dental.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

Apesar do amplo emprego das técnicas de clareamento dental atualmente disponíveis no mercado odontológico, a elevada prevalência de sensibilidade pós-operatória relatada pelos pacientes tem atraído a atenção de muitos pesquisadores (De Souza Costa et al.<sup>21</sup>, 2014). Os resultados de estudos clínicos randomizados demonstram que cerca de 80-100% dos pacientes submetidos à técnica de clareamento de consultório tradicional, onde géis com 35-38% de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) são aplicados por 30-60 minutos em cada sessão clínica, relatam sensibilidade dental durante a realização do procedimento, a qual pode se estender por períodos de até 48 horas pós-clareamento. Em cerca de 60% dos casos, a intensidade da sensibilidade é considerada de moderada a severa, podendo resultar até mesmo em interrupção do procedimento. A duração e intensidade da sensibilidade dental são intensificados quando a terapia clareadora é realizada associada a fontes de luz (Reis et al.<sup>40</sup>, 2011; Reis et al.<sup>41</sup>, 2011; Kossatz et al.<sup>27</sup>, 2011; De Almeida et al.<sup>16</sup>, 2012; Tay et al.<sup>62</sup>, 2012; Martin et al.<sup>33</sup>, 2013; De Paula et al.<sup>19</sup>, 2015).

Baseado em diversas evidências científicas presentes na literatura dentro desta linha de estudo, pode-se considerar que a fisiopatologia relacionada à indução da sensibilidade dental mediada pelo clareamento apresenta uma relação direta com a quantidade de  $H_2O_2$  capaz de se difundir pela estrutura dental e alcançar a câmara pulpar (De Souza Costa et al.<sup>20</sup>, 2010; Soares et al.<sup>49</sup>, 2013; Duque et al.<sup>22</sup>, 2014; Soares et al.<sup>50</sup>, 2014; Soares et al.<sup>52</sup>, 2015; Soares et al.<sup>53</sup>, 2015). Para que o clareamento da estrutura dental seja efetivo, é necessário que o  $H_2O_2$  reaja com os componentes orgânicos presentes na dentina, promovendo sua oxidação e consequente quebra de ligações moleculares, reduzindo o índice de absorção de luz do elemento dental (Carey<sup>10</sup>, 2014). O baixo peso molecular do  $H_2O_2$  favorece sua rápida movimentação pelos espaços interprismáticos do esmalte (Ubal dini et al.<sup>64</sup>, 2013). Consequentemente, uma elevada quantidade de  $H_2O_2$  é capaz de atingir a dentina poucos minutos após a aplicação do gel clareador na superfície dental (Camargo et al.<sup>9</sup>, 2007; Marson et al.<sup>32</sup>, 2015). No entanto, o potencial de oxidação do  $H_2O_2$  é considerado como o mais baixo dentre as espécies reativas derivadas do oxigênio (EROs), medida que demonstra a tendência de uma espécie química em

doar elétrons levando à oxidação e fragmentação de substratos orgânicos (Suty et al.<sup>61</sup>, 2004). Esta propriedade inerente ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> resulta em uma grande quantidade de moléculas não-reagidas dentro da estrutura da dentina, denominadas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> residual (Soares et al.<sup>56</sup>, 2016). A presença de elevada quantidade de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> residual na dentina resulta em difusão deste em direção à câmara pulpar através dos túbulos dentinários, os quais caracterizam uma via de ligação direta com a câmara pulpar (De Souza Costa et al.<sup>21</sup>, 2014; Soares et al.<sup>56</sup>, 2016).

O contato de células pulpares com elevadas concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> residual proveniente dos agentes clareadores resulta em redução da viabilidade celular, associada a indução de estresse oxidativo, ruptura da membrana celular, expressão de mediadores pró-inflamatórios e ativação de proteases teciduais, tal como observado em estudos *in vitro* e *in situ* (Sato et al.<sup>45</sup>, 2013; Soares et al.<sup>50</sup>, 2014; Soares et al.<sup>54</sup>, 2015; Soares et al.<sup>55</sup>, 2015; Soares et al.<sup>57</sup>, 2016). Na condição *in vivo*, intensa reação inflamatória aguda associada a desorganização tecidual foi demonstrada em estudos histopatológicos em dentes humanos (De Souza Costa et al.<sup>20</sup>, 2010). Esses eventos patológicos têm sido relacionados com a sensibilidade dental relatada pelos pacientes que se submetem ao clareamento dental, visto que a produção de mediadores de hiperalgesia é esperada nestas condições (Markowitz et al.<sup>31</sup>, 2010). Ainda, tem sido demonstrado que o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> é capaz de sensibilizar diretamente receptores nociceptivos presentes em fibras nervosas aferentes do tecido pulpar (Park et al.<sup>39</sup>, 2006; Andersson et al.<sup>2</sup>, 2008; Sawada et al.<sup>46</sup>, 2008), o que pode contribuir para o estabelecimento do quadro de hipersensibilidade dental aguda. O estresse oxidativo patológico mediado pelo excesso de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no ambiente extracelular também leva à redução da capacidade regenerativa das células pulpares, visto que nessas condições a expressão de marcadores de diferenciação odontoblástica é afetada negativamente, retardando o processo de reparo (Lee et al.<sup>29</sup>, 2013; Soares et al.<sup>52</sup>, 2015; Soares et al.<sup>55</sup>, 2015).

A intensidade dos efeitos adversos do clareamento dental é diretamente proporcional à concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> residual em contato com as células (Soares et al.<sup>50</sup>, 2014). Conforme amplamente demonstrado, quanto maior a concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no agente clareador e o tempo de contato com a estrutura dental, maiores as concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> detectadas na câmara pulpar *in vitro* (Soares et al.<sup>49</sup>, 2013; Duque et al.<sup>22</sup>, 2014; Soares et al.<sup>50</sup>, 2014; Soares et al.<sup>51</sup>, 2015; Soares et al.<sup>53</sup>, 2015). Desta forma, o clareamento de consultório tradicional pode ser considerado

como a terapia clareadora mais agressiva ao complexo dentino-pulpar, devido aos elevados níveis de  $H_2O_2$  detectados na câmara pulpar após realização deste procedimento (De Souza Costa et al.<sup>21</sup>, 2014; Soares et al.<sup>56</sup>, 2016). De acordo com estudos laboratoriais empregando-se discos de esmalte/dentina com 3,5 mm de espessura adaptados a câmaras pulpares artificiais, simulando incisivos centrais superiores, a aplicação de um gel com 35% de  $H_2O_2$  por 3x 15 minutos promoveu redução em torno de 50-60% na viabilidade de células odontoblastóides após exposição das mesmas por 1 hora ao meio rico no  $H_2O_2$  residual proveniente desta técnica (Soares et al.<sup>49</sup>, 2013; Duque et al.<sup>22</sup>, 2014; De Almeida et al.<sup>17</sup>, 2015; Soares et al.<sup>52</sup>, 2015); cerca de 95-98% de redução na viabilidade foi observada para estas células após 24 horas de exposição a este meio (Coldebella et al.<sup>13</sup>, 2009; Trindade et al.<sup>63</sup>, 2009). Células pulpares provenientes de dentes humanos apresentaram sensibilidade ainda mais exacerbada aos componentes dos géis clareadores de consultório. Cerca de 97% de redução na viabilidade celular foi observada após exposição por apenas 1 hora aos componentes liberados (Duque et al.<sup>22</sup>, 2014; Soares et al.<sup>50</sup>, 2014). Assim, apesar da elevada eficácia clareadora proporcionada por esta terapia, a mesma tem sido bastante questionada do ponto de vista biológico.

Até o presente momento, a técnica de clareamento caseiro ainda é considerada como a modalidade de tratamento que apresenta menor risco de alterações severas no complexo dentino-pulpar (Soares et al.<sup>48</sup>, 2011; Boushell et al.<sup>6</sup>, 2012; Lima et al.<sup>30</sup>, 2013; Duque et al.<sup>22</sup>, 2014; De Almeida et al.<sup>18</sup>, 2015). No entanto, a técnica caseira apresenta como principal fator limitador o fato do paciente aplicar o produto sem a direta supervisão do profissional, o que pode acarretar em ingestão de material decorrente do mal posicionamento da moldeira durante o uso (Briso et al.<sup>7</sup>, 2010; De Almeida et al.<sup>16</sup>, 2012; Kossatz et al.<sup>27</sup>, 2011; Carey<sup>10</sup> 2014). Ainda, em casos onde o paciente apresenta restaurações, trincas e malformações de esmalte, ou áreas de dentina exposta, o clareamento caseiro deve ser contra-indicado, devido ao risco de aumento na difusão de  $H_2O_2$  na câmara pulpar após aplicação inadvertida sobre regiões críticas, intensificando a toxicidade e a sensibilidade pós-clareamento (Lima et al.<sup>30</sup>, 2013; Bonafé et al.<sup>3</sup>, 2013; Bonafé et al.<sup>4</sup>, 2014; Özcan et al.<sup>38</sup>, 2014; Soares et al.<sup>52</sup>, 2015; Briso et al.<sup>8</sup>, 2015).

Assim, o clareamento de consultório ainda se apresenta como uma técnica importante dentro da Odontologia Estética Moderna. Atualmente, busca-se o

desenvolvimento de géis clareadores e/ou o estabelecimento de protocolos de clareamento de consultório que aliem a eficácia estética e biocompatibilidade com o tecido pulpar (De Souza Costa et al.<sup>21</sup>, 2014). Conforme discutido acima, a redução da difusão de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> residual para a câmara pulpar é considerado como ponto chave para minimização dos efeitos adversos desta terapia. Assim, novos parâmetros para o clareamento dental de consultório têm sido pesquisados com o objetivo de reduzir a penetração do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na câmara pulpar, minimizando os danos oxidativos no tecido pulpar. Algumas alternativas propostas têm sido baseadas na redução da concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no gel clareador, bem como no tempo de contato do produto sobre a superfície de esmalte (Soares et al.<sup>50</sup>, 2014; Soares et al.<sup>51</sup>, 2014; Soares et al.<sup>52</sup>, 2015; Soares et al.<sup>53</sup>, 2015; Soares et al.<sup>55</sup>, 2015; Soares et al.<sup>57</sup>, 2016). Estudos clínicos demonstraram que a porcentagem de pacientes que relatam sensibilidade dental, bem como a intensidade e duração da mesma, são reduzidos quando géis clareadores contendo 15-20% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> são empregados (Moncada et al.<sup>37</sup>, 2013; Özcan et al.<sup>38</sup>, 2014; Bortolatto et al.<sup>5</sup>, 2014). Em estudos laboratoriais, têm sido demonstrado que géis contendo 17,5 a 20% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> resultaram em significativa redução do efeito tóxico imediato em relação protocolo tradicional (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 35%, 3x 15 minutos), associado a maior capacidade de recuperação em um curto período de tempo (72 horas) (Soares et al.<sup>50</sup>, 2014; Soares et al.<sup>52</sup>, 2015). No entanto, células provenientes do tecido pulpar de dentes humanos, com predominância de células tronco, apresentaram, ainda, intensa redução de sua viabilidade (65% a 97%) quando expostas a estas técnicas alternativas (Soares et al.<sup>50</sup>, 2014). Em estudo recente, observou-se que a citotoxicidade para estas células foi drasticamente reduzida apenas quando géis com 10 e 8% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foram aplicados por 15 minutos na superfície dental, sendo que as mesmas apresentaram parâmetros de viabilidade e morfologia similares ao controle negativo após 72 horas (Soares et al.<sup>53</sup>, 2015). Apesar da aceitável citocompatibilidade observada quando da análise in vitro destas técnicas alternativas de clareamento dental, já foi demonstrado que quanto menor a concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no gel clareador e o tempo de contato deste gel com a superfície dental, menor a eficácia clareadora em curto prazo, o que pode limitar o emprego clínico destas terapias (Soares et al.<sup>51</sup>, 2014).

Recentemente, estudos clínicos detectaram que a sensibilidade dental é limitada aos dentes anteriores da arcada dental, sendo que a prevalência e intensidade deste efeito adverso apresenta uma correlação negativa com a

espessura de esmalte/dentina do elemento dental submetido ao clareamento (De Almeida et al.<sup>16</sup>, 2012; Bonafé et al.<sup>3</sup>, 2013; Bonafé et al.<sup>4</sup> 2014). A seguinte ordem crescente de susceptibilidade foi encontrada: caninos < incisivos centrais superiores < incisivos laterais superiores < incisivos inferiores (De Souza Costa et al.<sup>20</sup>, 2010; Bonafé et al.<sup>3</sup>, 2013; Bonafé et al.<sup>4</sup> 2014; Roderjan et al.<sup>42</sup>, 2014; Roderjan et al.<sup>43</sup>, 2015). Assim, a sensibilidade dental pós-clareamento é mais intensa e prevalente nos dentes com menor espessura de esmalte/dentina. Rodrigues et al.<sup>44</sup> (2009) demonstraram que a permeabilidade de dentes anteriores é aumentada significativamente após o clareamento interno com um gel contendo 38% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, enquanto que pré-molares não sofrem alterações quando submetidos a mesma terapia. De acordo com os autores, este fenômeno demonstra que os dentes anteriores são mais permeáveis aos agentes clareadores. Ao mesmo tempo, esta característica facilita a eficácia clareadora neste grupo de dentes, visto que também foi detectado que a profundidade de clareamento foi maior nos dentes anteriores em comparação aos dentes posteriores. O efeito da espessura dental sobre o tecido pulpar foi previamente observado em estudo histopatológico realizado em dentes humanos submetidos ao clareamento de consultório. Ficou constatado que incisivos inferiores apresentaram intensas alterações no tecido pulpar quando submetidos a uma sessão clareadora composta por 3 aplicações de 10 minutos de um gel contendo 38% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, sendo os seguintes achados histopatológicos observados: desestruturação da camada odontoblástica, áreas de necrose superficial, desorganização tecidual e reação inflamatória aguda; por outro lado, pré-molares submetidos à mesma terapia clareadora apresentaram características histopatológicas de normalidade (De Souza Costa et al.<sup>20</sup>, 2010).

Diante das evidências científicas disponíveis na literatura, acredita-se que da mesma forma que observado para a prevalência de sensibilidade dental, a eficácia clareadora deva ser proporcional à espessura de esmalte e dentina do dente a ser clareado. Como a espessura de dentina em incisivos é mais delgada do que àquela observada em pré-molares (De Souza Costa et al.<sup>20</sup>, 2010), surge a hipótese de que este grupo de dentes anteriores possa ser clareado com géis contendo baixas concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de forma tão efetiva quanto àquela obtida quando do emprego do protocolo tradicional de consultório realizado em dentes mais espessos. Desta forma, terapias clareadoras específicas poderiam ser recomendadas para grupos específicos de dentes, estabelecendo-se, assim, protocolos de clareamento

esteticamente efetivos e biologicamente seguros de acordo com a espessura de esmalte e dentina dos dentes a serem clareados. O estabelecimento de tais terapias trará grandes benefícios para a Odontologia Estética Moderna, visto que as mesmas irão prover conforto e segurança para a realização de um procedimento estético simples e conservador, que poderá ser realizado sob supervisão profissional.

### **3 PROPOSIÇÃO**

O presente trabalho teve o objetivo avaliar a influência da espessura do esmalte/dentina sobre a citotoxicidade e eficácia clareadora de um gel contendo 10% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, aplicado por diferentes períodos sobre a superfície dental.

#### **3.1 Objetivos Específicos**

1 - Avaliar a citotoxicidade trans-amelodentinária de diferentes protocolos de clareamento sobre células pulpares humanas, variando-se a espessura de esmalte/dentina com o objetivo de simular dentes anteriores e posteriores;

2 - Avaliar a expressão de marcadores fenotípicos de células pulpares em diferentes períodos pós-clareamento, de forma a observar a possível capacidade regenerativa destas células frente ao estresse oxidativo promovido pelos tratamentos propostos;

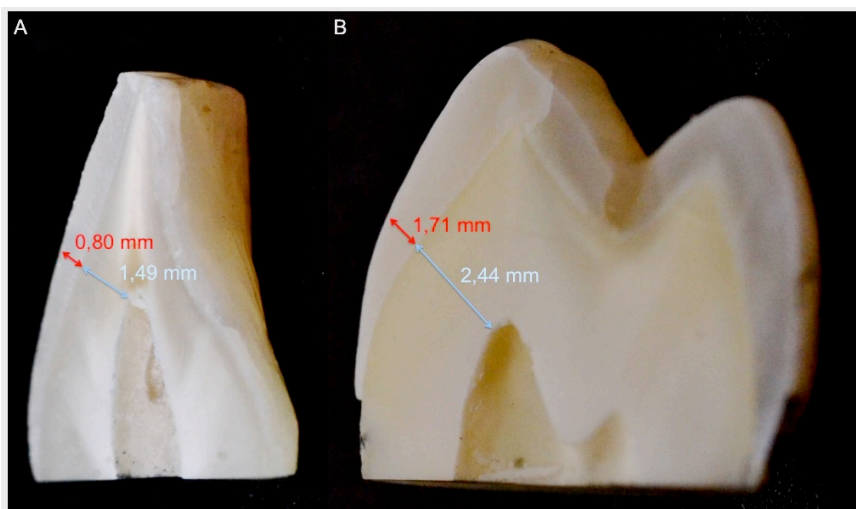
3 – Determinar a eficácia clareadora promovida por distintos protocolos de clareamento experimentais de acordo com a espessura do substrato dental, a fim de estabelecer o número de sessões necessárias para que cada tratamento em estudo cause resultado estético similar ao protocolo de clareamento tradicionalmente empregado em consultório.

## 4 MATERIAL E MÉTODO

### 4.1. Determinação da Espessura de Esmalte/Dentina dos Discos

Inicialmente, incisivos centrais inferiores e segundos pré-molares superiores humanos hígidos foram coletados no Banco de Dentes da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, mediante aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos desta mesma unidade (CAAE: 3467314.0.0000.5416) (ANEXO). Foi realizado um corte sagital no sentido do longo eixo do dente na porção central dos mesmos, utilizando-se para isto uma cortadeira metalográfica (ISOMET 1000, Buehler Ltda., Lake Bluf, IL, EUA) acoplada a um disco de diamante (11-4254, 4”x 0,012”/ série 15LC, Diamond Wafering blade, Buehler Ltda., Lake Bluf, IL, EUA). Após realização do corte sagital, apenas dentes sem atresia da câmara pulpar foram selecionados. A mensuração da quantidade de esmalte e dentina foi realizada no terço médio da face vestibular, no ápice do corno pulpar por meio fotografias obtidas em lupa estereoscópica, sendo as imagens analisadas em software Image J (National Institute of Health) (Figura 1). Três mensurações foram realizadas para obtenção de uma média representativa desta região. Os valores obtidos para os dentes avaliados (n = 4) estão demonstrados na Tabela 1.

**Figura 1-** Imagem representativa da mensuração (mm) de esmalte (seta vermelha) e dentina (seta azul) dos incisivos inferiores (A) e pré-molares (B).



Fonte: Elaboração Própria

**Tabela 1-** Espessura de esmalte/dentina de incisivos centrais inferiores e segundo pré-molares superiores.

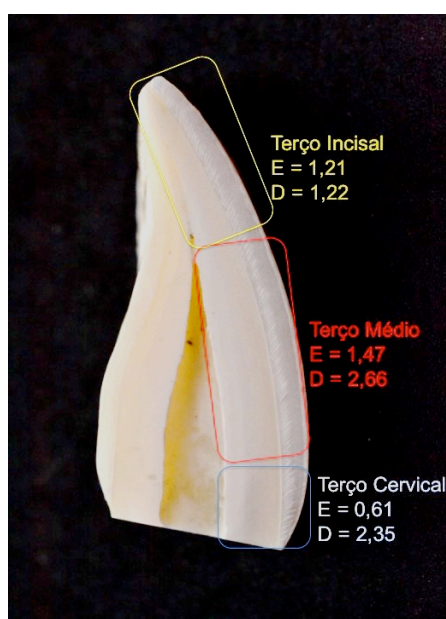
Espessura					
ICI			PMS		
Esmalte (mm)	Dentina (mm)	Espessura Total	Esmalte (mm)	Dentina (mm)	Espessura Total
0,66	1,39	2,05	1,92	2	3,92
0,71	1,7	2,41	1,56	2,69	4,25
0,93	1,45	2,38	2,23	2,71	4,94
0,92	1,41	2,33	1,15	2,38	4,52
<b>0,80 (± 0,14)</b>	<b>1,49 (± 0,14)</b>	<b>2,29 (± 0,16)</b>	<b>1,71* (± 0,47)**</b>	<b>2,44 (± 0,33)</b>	<b>4,00 (± 0,60)</b>

\* Valores médios; \*\* Desvio-Padrão

Fonte: Elaboração Própria

Da mesma forma, incisivos de novilhos com idade entre 24 e 30 meses (n = 10) foram submetidos ao corte longitudinal para mensuração da espessura de esmalte e dentina em três regiões distintas na face vestibular (terços cervical, médio e incisal), de forma a se determinar em quais regiões dos dentes bovinos seriam obtidos discos com espessura de esmalte similares àquelas observadas para o terço médio da face vestibular os incisivos e pré-molares humanos selecionados (Figura 2). Um total de três mensurações foram realizados em cada terço para obtenção de uma média representativa de cada região de interesse da face vestibular (Tabela 2).

**Figura 2** - Representação esquemática das regiões da face vestibular dos incisivos bovinos onde foram realizadas as mensurações das espessuras (mm) de esmalte (E) e dentina (D).



Fonte: Elaboração Própria

**Tabela 2** - Espessura média de esmalte e dentina dos dentes bovinos nos terços incisal, médio e cervical.

Terço Incisal			Terço Médio			Terço Cervical		
Esmalte (mm)	Dentina (mm)	Espessura Total	Esmalte (mm)	Dentina (mm)	Espessura Total	Esmalte (mm)	Dentina (mm)	Espessura Total
1,13	0,71	1,84	1,53	2,45	3,98	0,32	2,39	2,71
1,19	1,09	2,28	1,46	2,62	4,08	0,53	2,26	2,79
1,31	0,75	2,06	1,45	2,2	3,65	0,65	1,95	2,6
1,3	1,23	2,53	1,49	2,8	4,29	0,67	1,8	2,47
1,29	1,35	2,64	1,33	2,68	4,01	0,54	2,4	2,94
1,06	0,76	1,82	1,28	2,66	3,94	0,56	2,25	2,81
1,14	1,63	2,77	1,45	2,89	4,34	0,68	2,38	3,06
1,14	1,74	2,88	1,72	2,86	4,58	0,71	2,68	3,39
1,32	1,17	2,49	1,64	2,63	4,27	0,7	2,6	3,3
1,22	1,73	2,95	1,35	2,8	4,15	0,75	2,77	3,52
<b>1,21*(± 0,09)**</b>	<b>1,22 (± 0,37)</b>	<b>2,42 (± 0,41)</b>	<b>1,47 (± 0,13)</b>	<b>2,66 (± 0,21)</b>	<b>4,12(± 0,25)</b>	<b>0,61 (± 0,12)</b>	<b>2,35 (± 0,28)</b>	<b>2,95 (± 0,35)</b>

\* Valores médios; \*\* Desvio-Padrão

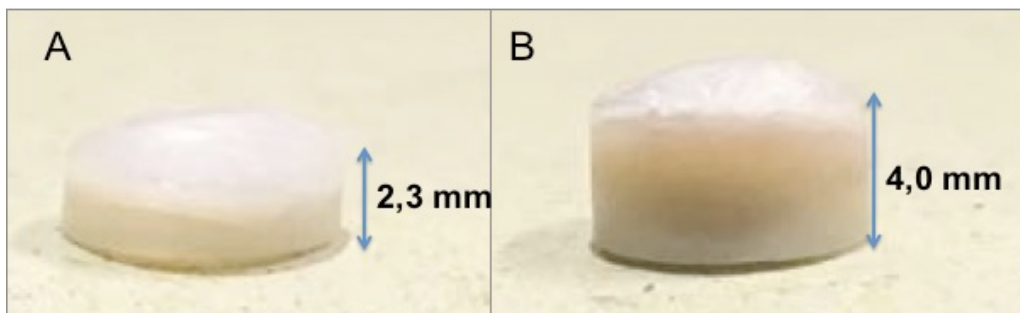
Fonte: Elaboração Própria

De acordo com os dados obtidos para os dentes humanos coletados (Tabela 1), a espessura média de esmalte e dentina dos incisivos inferiores foi de 0,80 mm e 1,49 mm, respectivamente (espessura total = 2,29 mm). Para os pré-molares, os valores médios de esmalte e dentina obtidos foram de 1,71 mm e 2,44 mm, respectivamente (espessura total = 4,00 mm). Estes dados corroboram os achados presentes na literatura para estes dois grupos de dentes (Schillingburg, Grace<sup>47</sup>, 1973; Stroud et al.<sup>58</sup>, 1994; Suileman et al.<sup>60</sup>, 2005; De Souza Costa et al.<sup>20</sup> 2010). As mensurações realizadas na face vestibular dos incisivos bovinos demonstraram as seguintes espessuras média: terço incisal – esmalte = 1,21 mm; dentina = 1,22 mm; terço médio – esmalte = 1,47 mm; dentina – 2,66 mm; terço cervical – esmalte = 0,61 mm; dentina = 2,35 mm. Apesar do terço cervical ter apresentado os menores valores de esmalte, esta região não permitia a obtenção de discos de esmalte/dentina com superfícies planas. Assim, a região média foi selecionada para obtenção de todos os discos de esmalte/dentina, sendo a espessura de esmalte de cada disco mensuradas para distribuição dos mesmos entre os grupos experimentais. Desta forma, a direção dos prismas de esmalte e dos túbulos dentinários em todos os grupos foram padronizados.

## 4.2 Obtenção dos Discos de Esmalte/Dentina

De forma a obter discos de esmalte/dentina com as espessuras previamente estabelecidas, um total de 360 discos foram coletados na porção média da face vestibular dos incisivos bovinos (24 e 30 meses). Dentes com manchas, desgaste excessivo do terço incisal, alterações morfológicas da coroa e trincas no esmalte não foram selecionados. Os discos foram obtidos a partir de uma broca diamantada trefina (Dinser brocas diamantadas LTDA, São Paulo, SP, Brasil) acoplada a uma furadeira de bancada (FSB 16 Pratika, Schultz, Joinville, SC, Brasil) em ambiente submerso em água a 4°C, obtendo-se discos com diâmetro padronizado em 5,6 mm. Discos com trincas na superfície de esmalte foram descartados. Os discos coletados tiveram suas espessuras de esmalte e dentina mensuradas com paquímetro digital, sendo um total de 180 discos selecionados. Em seguida, os discos sofreram desgastes na superfície dentinária com lixas d'água de granulação 400 e 600 (T469-SF- Noton, Saint-Gobam Abrasivos Ltda., Jundiaí, SP, Brasil) para padronização da espessura de dentina. Os discos foram então distribuídos nos seguintes grupos: **Grupo ICI** (incisivos inferiores) – espessura total =  $2,30 \pm 0,20$  mm; esmalte =  $0,97 \pm 0,10$  mm; dentina =  $1,33 \pm 0,10$  mm; **Grupo PMS** (pré-molares) – espessura total =  $4,00 \pm 0,20$  mm; esmalte =  $1,05 \pm 0,10$  mm; dentina =  $2,95 \pm 0,10$  mm (Figura 3). A superfície de esmalte não sofreu desgastes superficiais, sendo a mesma submetida a profilaxia com solução de pedra-pomes e água em baixa rotação para remoção de pigmentos superficiais.

**Figura 3** - Imagem representativa dos discos de esmalte e dentina nos Grupos ICI (A) e PMS (B).



Fonte: Elaboração Própria

### 4.3 Protocolos de Clareamento

Os grupos experimentais estão descritos na Tabela 3. O protocolo de clareamento de consultório tradicional caracterizado pela aplicação de um gel com 35% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Whiteness HP, FGM, Joinville, SC, Brazil) por três vezes de 15 minutos foi empregado como controle positivo, visto que este protocolo apresenta resultados de citotoxicidade trans-amelodentinária sobre as células pulpares humanas (Duque et al.<sup>22</sup>, 2014; Soares et al.<sup>50</sup>, 2014) e eficácia clareadora (Soares et al.<sup>51</sup>, 2014) padronizados no nosso grupo de pesquisa para as metodologias utilizadas na presente investigação.

A concentração experimental 10% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi alvo da presente investigação. A escolha desta concentração foi baseada em dados de estudos prévios realizados pelo nosso grupo que demonstraram efeito tóxico limitado sobre células pulpares humanas in vitro em comparação com o protocolo tradicional (Soares et al.<sup>53</sup>, 2015). O gel experimental com 10% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi obtido a partir da diluição do líquido do gel com 35% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em água deionizada (1:6). A diluição foi realizada imediatamente antes da aplicação do gel sobre o espécime. Nenhum tratamento foi realizado sobre a superfície de esmalte no grupo controle negativo.

**Tabela 3** - Grupos experimentais de acordo com a concentração do gel clareador, espessura de esmalte/dentina e protocolo de aplicação.

Grupos	Concentração do gel	Espessura simulada	Protocolo (min)
G1*	-	Incisivo	-
G2**	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 35%	Incisivo	3 x 15
G3	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 10%	Incisivo	3 x 15
G4	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 10%	Incisivo	1 x 15
G5	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 10%	Incisivo	1 x 5
G6***	-	Pré-molar	-
G7****	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 35%	Pré-molar	3 x 15
G8	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 10%	Pré-molar	3 x 15
G9	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 10%	Pré-molar	1 x 15
G10	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 10%	Pré-molar	1 x 5

\*Controle negativo Grupo ICI; \*\*Controle positivo Grupo ICI; \*\*\* Controle negativo Grupo PMS; \*\*\*\* Controle positivo Grupo PMS.

Fonte: Elaboração Própria

## **4.4 Avaliação da Citotoxicidade Trans-Amelodentinária**

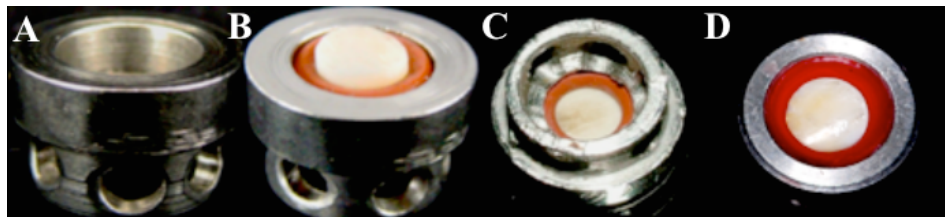
### **4.4.1 Cultura primária de células pulpares humanas (HDPCs)**

Dois terceiros molares hígidos recém extraídos foram coletados de um doador do sexo masculino com 20 anos de idade, atendido na Clínica de Cirurgia da Faculdade de Odontologia de Araraquara/UNESP. Para participação na pesquisa o paciente assinou o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (CAAE: 3467314.0.0000.5416; Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Araraquara/UNESP) (ANEXO). Após a extração, os dentes foram imediatamente acondicionados em tubos falcon contendo PBS (solução tampão de fosfatos) suplementado com antibióticos (100 U/mL penicilina, 100 µg/mL estreptomicina; Gibco, Grand Island, NY, USA). Uma canaleta horizontal 1 mm abaixo da junção amelodentinária foi confeccionada com ponta diamantada acoplada a motor de alta rotação em ambiente asséptico sob constante refrigeração. Em capela de fluxo laminar, a porção coronária foi separada da radicular, realizando-se a exposição pulpar. O tecido pulpar foi então removido com limas endodônticas e cortado com lâmina de bisturi nº 15 em fragmentos de 1 mm, os quais foram incubados a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> durante 24 horas em meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; suplementado com 100 IU/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina, 2 mmol/L de glutamina; Gibco) e 200 units/mL de colagenase Tipo II (Worthington Biochemical Corporation, Lakewood, NJ, USA). Em seguida, as células foram centrifugadas, sendo cultivadas e subcultivadas em DMEM com 10% SFB (soro fetal bovino; Gibco). Células entre as 4<sup>a</sup>-6<sup>a</sup> passagens foram empregadas no presente estudo.

#### 4.4.2 Procedimento experimental

Um total de 40 discos de esmalte/dentina representativos de cada espessura (Grupos ICI e PMS) foram selecionados para esta análise. A superfície de dentina foi tratada com solução de EDTA 0,5 N durante 30 segundos seguido de lavagem com água deionizada, para remoção da smear layer. Os discos foram adaptados no compartimento superior de câmaras pulpares artificiais (CPA) por meio de dois anéis de silicone (Figura 4A-C). A região dos anéis de silicone foi selada com cera utilidade de forma a impedir o contato do gel clareador com esta região (Figura 4D). Em seguida, os conjuntos disco/CPA foram esterilizados por óxido de etileno.

**Figura 4** - Posicionamento do disco de esmalte/dentina no dispositivo CPA. A- Visão dos compartimentos superior e inferior das CPAs. B – Disco adaptado no compartimento superior da CPA entre dois anéis de silicone, com a superfície de esmalte exposta para realização do clareamento. C – Vista da superfície de dentina do disco no compartimento inferior da CPA, cujas perfurações permitem o contato direto do meio de cultura com a dentina para obtenção do extrato. D - Visão superior dos discos adaptados nas CPAs após selamento com cera utilidade.

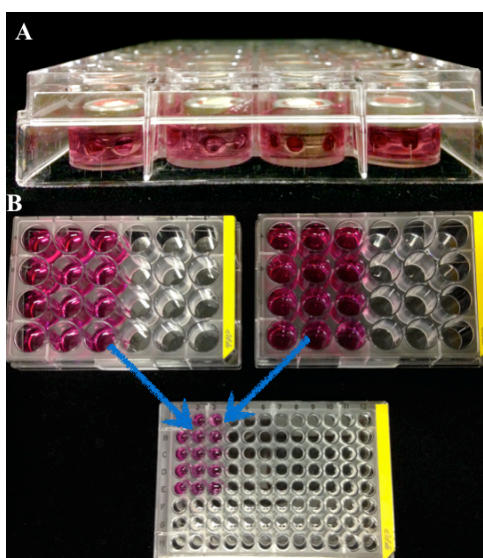


Fonte: Elaboração Própria

As células foram semeadas em um padrão de 80% de confluência em placas de 96 ou 24 compartimentos, sendo um total de  $1 \times 10^4$  e  $6 \times 10^4$  células semeadas, respectivamente, e incubadas por um período de 24 horas a  $37^\circ\text{C}$  e 5% de  $\text{CO}_2$ . Os conjuntos disco/CPA foram posicionados em placas de 24 compartimentos de forma invertida, sendo 2 mL de DMEM sem SFB adicionados. Em seguida, as CPAs foram giradas dentro do compartimento das placas de cultura, sendo um total de 1 mL removido para promover exposição da superfície de esmalte, sobre a qual foram realizados os protocolos de clareamento descritos na Tabela 3. Este procedimento foi realizado com o objetivo de evitar a formação de bolhas na superfície dentinária. Desta forma, o meio de cultura permaneceu em íntimo contato com a dentina (Figura 5A), e, assim, os componentes dos géis clareadores capazes de se difundir por toda espessura de esmalte e dentina se acumularam no meio de cultura, denominado

neste momento de extrato. Imediatamente após o término dos protocolos clareadores, os conjuntos disco/CPA foram removidos, sendo todo extrato coletado e distribuído em alíquotas, as quais foram aplicadas por um período de 1 hora (37°C e 5% de CO<sub>2</sub>) sobre as células previamente semeadas (Figura 5B). Os extratos provenientes de 6 conjuntos disco/CPA para cada grupo experimental foram distribuídos em alíquotas de 100 µL para aplicação sobre as células semeadas em placas de 96 compartimentos e realização dos procedimentos descritos nos tópicos 4.4.4 a 4.4.7, bem como para quantificação do total de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> presente nos extratos (tópico 4.4.8). Os extratos de dois dispositivos disco/CPA adicionais foram divididos em alíquotas de 500 uL, as quais foram empregadas para análise da morfologia celular, conforme descrito no tópico 4.4.3. Os parâmetros celulares foram avaliados em 4 períodos distintos: T1 (0 horas) – imediatamente após exposição aos extratos; T2 (72 horas) – após o tempo de contato com o extrato, este foi aspirado, sendo as células cultivadas por um período adicional de 72 horas em DMEM com 10% SFB; T3 (14 dias) e T4 (21 dias) - após remoção dos extratos, as células foram cultivadas por um período adicional de 14 ou 21 dias em meio de cultura osteogênico (DMEM com 10% SFB, suplementado com 10 nmol/L β-glicerofosfato e 50 ug/mL ácido L-ascórbico; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA), sendo o meio trocado a cada 48 horas.

**Figura 5** - A - Posicionamento dos conjuntos disco/CPA em placas de 24 compartimentos para obtenção do extrato. B – representação esquemática das alíquotas do extrato sendo aplicadas sobre as células previamente semeadas em placas de 96 compartimentos.



Fonte: Elaboração Própria

#### **4.4.3 Avaliação da morfologia celular**

A análise da morfologia celular ( $n = 2$ ) foi analisada nos períodos T1 e T2 em células aderidas em lamínulas de vidro posicionadas no fundo das placas de 24 compartimentos imediatamente antes do plantio. Em cada período de análise, as células que permaneceram aderidas foram fixadas por uma hora em 1 mL de glutaraldeído tamponado a 2,5%. Em seguida, foi realizado o seguinte protocolo: pós-fixação com tetróxido de ósmio 2%, desidratação em soluções crescentes de etanol (30%, 50%, 70%, 90% e 100%) e lavagem com HMDS (1,1,3,3,3, hexametildisilazano). As lamínulas foram fixadas em stubs metálicos e mantidas por 7 dias em dessecador. Em seguida, a superfície das amostras foi metalizada com ouro e analisada em microscópio eletrônico de varredura (MEV - JEOL-JMS-T33A Scanning Microscope, Tóquio, Japão).

#### **4.4.4 Avaliação da viabilidade celular**

A análise da viabilidade celular foi realizada pelo teste do MTT (3,4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; Sigma) nos períodos T1 e T2 ( $n = 6$ ). Em cada período de análise, as células foram incubadas com DMEM sem SFB suplementado com o sal de MTT (5 mg/mL; Sigma) na proporção 10:1, sendo o conjunto incubado por 4 horas a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Em seguida, os cristais de formazan foram dissolvidos em isopropanol acidificado, sendo a absorbância mensurada a 570 nm (Synergy H1, BioTek, Winooski, VT, EUA). A média de absorbância do grupo controle negativo correspondente de cada espessura foi considerada como 100% de viabilidade celular, sendo a porcentagem de viabilidade celular para os grupos clareados calculada baseados neste parâmetro.

#### **4.4.5 Análise do estresse oxidativo**

O estresse oxidativo celular foi avaliado por meio da estimativa da produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) pelas células ( $n = 6$ ) imediatamente após o clareamento (T1). Esta sonda é permeável à membrana celular e fluoresce quando em contato com EROS. Desta maneira, previamente a exposição aos extratos, as

células foram tratadas com a sonda carboxy-H<sub>2</sub>DCFDA (Invitrogen, San Francisco, CA, USA) na concentração de 10 µg/mL durante 30 minutos. Imediatamente após o período de contato com os extratos, a intensidade de fluorescência foi avaliada a 592 nm excitação e 517 nm emissão (Synergy H1). Os dados foram então normalizados pelo grupo controle negativo, obtendo-se assim a proporção de aumento na intensidade de fluorescência para cada grupo experimental.

#### **4.4.6 Análise da atividade de fosfatase alcalina (ALP)**

A atividade de fosfatase alcalina foi realizada segundo protocolo do Kit de Fosfatase Alcalina – Ensaio de Ponto Final (Labtest Diagnóstico S.A., Lagoa Santa, Minas Gerais, Brasil) no período T3 (n = 6). As células foram submetidas à lise celular com lauril sulfato de sódio 0,1% (Sigma). Em um ambiente tamponado (pH 10,1) à 37°C, foi adicionado o substrato timolftaleína monofosfato (22 mmol/L), o qual é hidrolisado na presença de ALP, liberando timolftaleína. Em seguida, foi adicionado um reagente de cor (carbonato de sódio 94 mmol/L e hidróxido de sódio 250 mmol/L), o qual reage com timolftaleína hidrolisada alterando-se a cor do produto, sendo realizada uma análise fotométrica a 590 nm (Synergy H1). Para normalização da ALP, foi realizada dosagem da proteína total. Ao restante da amostra de cada compartimento, foram adicionados Solução de Reagente de Lowry (Sigma), a qual permaneceu em contato por 20 minutos em temperatura ambiente. Após esse período, foi adicionado Solução de Folin e Ciocalteu's Phenol Reagent (Sigma). Trinta minutos após, a absorbância dos tubos testes e branco foi lida no comprimento de onda de 655 nm (Synergy H1). A dosagem de ALP e proteína total foram calculadas a partir de uma curva-padrão. Os valores de atividade de ALP por mg de proteína foram transformados em porcentagem, considerando-se o valor médio do grupo controle negativo como 100% de atividade celular.

#### **4.4.7 Avaliação da formação de nódulos de mineralização**

A deposição de nódulos de mineralização foi quantificada por meio do teste de Alizarin Red no período T4 (n = 6). Após este período, as células foram fixadas

com etanol a 70% a 4°C por 1 hora, seguido de lavagem com água deionizada, e incubação com solução de Alizarin Red (40 mM, pH 4.2; Sigma) por 15 minutos sob agitação. Em seguida, as células foram lavadas 3 vezes com água deionizada. Foi aplicada então a solução de cloreto de cetilpiridíneo (Sigma) na concentração de 10 mM e pH 7.0, por 15 minutos, para dissolução dos nódulos, sendo realizada avaliação da absorvância a 570 nm (Synergy H1). Assim como realizado para os demais testes, o valor médio de absorvância do controle negativo foi considerado como 100% de coloração positiva.

#### **4.4.8 Quantificação do peróxido de hidrogênio**

A quantificação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi realizada pelo método descrito por Mottola et al.<sup>37</sup> (1970) adaptado para quantificação em extratos (Soares et al.<sup>49</sup>, 2013). Este método baseia-se em uma reação colorimétrica entre o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e um catalizador, a enzima peroxidase, em um meio que permite a estabilização H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (solução tampão acetato). Imediatamente após o clareamento (T1), uma alíquota de 100 µL de extrato de cada grupo experimental (n = 6) foi transferido para compartimentos contendo 900 µL de solução tampão acetato para estabilização do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Em seguida, 500 µL desta solução (solução tampão mais o extrato), foram transferidos para tubos de ensaio contendo água e corante violeta leucocristal (0,5 mg/mL; Sigma). Os tubos foram então agitados e adicionou-se 50 µL da enzima horseradish peroxidase (1 mg/mL; Sigma). A absorvância das soluções foi mensurada em espectrofotômetro com comprimento de onda de 596 nm. Uma curva padrão de quantidades conhecidas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi utilizada para a conversão dos valores de densidade óptica obtidos das amostras em µg de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por mL de extrato.

### **4.5. Avaliação da Eficácia Clareadora**

#### **4.5.1 Padronização dos discos de esmalte/dentina**

Para esta análise, um total de 50 discos de cada grupo de dentes teve a superfície de dentina tratada com EDTA 0,5 N por 30 minutos para remoção da smear layer, seguido de coloração em solução rica em pigmentos amarelados para

escurecimento e padronização da cor inicial. Para tanto, os discos foram submersos em uma solução de chá-preto (Leão Jr S. A., Fazenda Rio Grande, PR, Brasil), produzida pela filtração de 2 g de chá em 100 mL de água fervente durante 5 minutos (Soares et al.<sup>50</sup>, 2014), sendo incubados a 37°C por 24 horas (Grupo ICI) ou 6 dias (Grupo PMS), de forma que os valores de L\* e b\* fossem similares em ambas as espessuras. Após o período de incubação na solução de chá-preto, foi realizada profilaxia na superfície de esmalte com solução de pedra-pomes e água para remoção dos pigmentos superficiais e os espécimes foram mantidos em água destilada pelo período de 7 dias a 37°C para eliminação dos pigmentos que não foram completamente absorvidos pela dentina. Em seguida, os valores de L\* e b\* foram registrados por meio de um espectrofotômetro de reflexão ultravioleta visível, conforme descrição a seguir (tópico 4.5.3), sendo um total de 30 discos de cada espessura com valores similares de L\* e b\* selecionados e distribuídos nos grupos experimentais (n = 6).

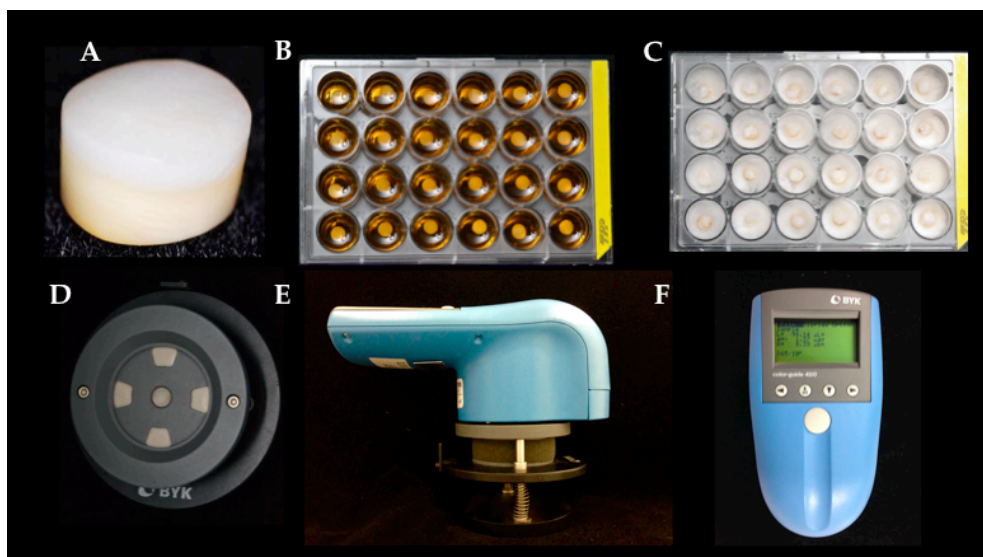
#### **4.5.2 Procedimento experimental**

A partir de uma metodologia previamente descrita (Soares et al.<sup>49</sup>, 2013) após distribuição dos discos nos grupos experimentais, os mesmos foram incubados em estufa a 37°C em ambiente úmido. Este procedimento consistiu em armazenamento dos discos em placas de 24 compartimentos com a superfície de dentina em contato com algodão embebido em água destilada, e a superfície de esmalte em contato com algodão embebido em saliva artificial, como realizado por Soares et al.<sup>48</sup> 2011. Os discos foram mantidos nesta condição por um período de 48 horas, sendo os valores iniciais de L\* a\* e b\* mensurados (baseline). O clareamento foi realizado na superfície de esmalte, conforme os protocolos descritos na Tabela 3, sendo um total de 6 sessões realizadas com intervalos de 48 horas. As mensurações dos valores de L\* a\* e b\* foram realizadas 48 horas após cada sessão, sendo os discos mantidos em ambiente úmido, conforme descrito acima, no intervalo das sessões.

### 4.5.3 Avaliação em espectrofotômetro de reflexão ultravioleta visível

A análise da alteração de cor dos espécimes foi realizada segundo o sistema CIE  $L^*a^*b^*$  estabelecido pela Comissão Internationale de l'Eclairage – CIE (Comissão Internacional sobre Iluminação). De acordo com esta escala de cor, a variável  $L^*$  é a medida do brilho do objeto e é quantificada em uma escala onde o preto apresenta um valor de  $L^*$  igual a zero e a luz totalmente refletida um valor de  $L^*$  igual a 100. A coordenada  $a^*$  é a medida da quantidade de vermelho ( $+a^*$ ) e verde ( $-a^*$ ); já a coordenada  $b^*$  representa a quantidade de amarelo ( $+b^*$ ) e azul ( $-b^*$ ). Para tanto, foi utilizado um Espectrofotômetro de Reflexão Ultravioleta Visível portátil (Color Guide, BYK Gardner GmbH Geretsried, Alemanha) com comprimento de onda variando de 400 nm a 700 nm, iluminação padrão D65 e ângulo de iluminação/observação  $45/0^\circ$ . Os espécimes foram posicionados em uma matriz de silicone branco, de forma que apenas a superfície de esmalte permaneceu exposta. O espectrofotômetro foi posicionado sobre o espécime de forma padronizada com o auxílio de um suporte, sendo realizadas três leituras em cada análise, obtendo-se uma média. A alteração total de cor foi obtida a partir da seguinte equação:  $\Delta E^* = [(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]^{1/2}$ . Todos os procedimentos empregados para análise da alteração de cor estão descritos na Figura 6.

**Figura 6-** Imagens ilustrativas da análise da alteração de cor dos discos. A- vista aproximada de um espécime padronizado; B- posicionamento dos discos de esmalte/dentina em uma placa de 24 compartimentos contendo a solução de chá preto; C- posicionamento dos discos em ambiente úmido; D – posicionamento dos discos na matriz de silicone para leitura de variação de cor. E- vista lateral dos discos posicionados para leitura; E- vista aproximada do espectrofotômetro com os resultados da leitura de cor.



Fonte: Elaboração Própria

## 4.6 Análise Estatística

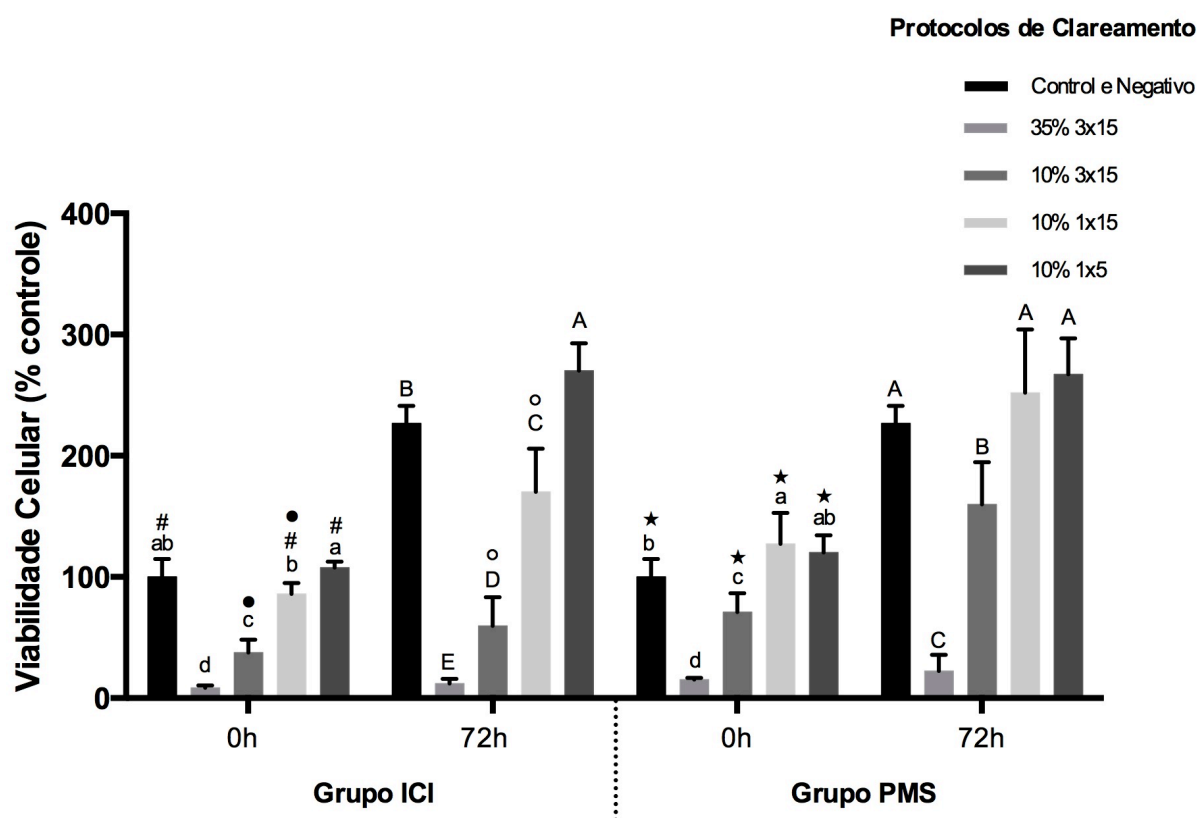
Para verificar a reprodutibilidade dos dados, dois experimentos independentes foram realizados para todos os protocolos neste estudo. Em seguida, os dados compilados foram submetidos ao teste de Kolmogorov-Smirnov e Levene para verificação dos aspectos de normalidade e homocedasticidade. Os dados obtidos para as variáveis: viabilidade celular, estresse oxidativo, atividade de ALP, alizarin red e quantificação de  $H_2O_2$  foram avaliados pelo teste de ANOVA a dois critérios. O teste de Sidak foi empregado para identificação das diferenças entre os períodos de análise (T1 x T2) e entre as espessuras (Grupo ICI x Grupo PMS), para cada protocolo de clareamento. O teste de Tukey foi utilizado para identificação das diferenças entre os protocolos de clareamento, dentro de cada período de análise e espessura de esmalte/dentina. Os dados de  $\Delta E$  para o protocolo 35% 3x15 foram analisados pelo teste de ANOVA a dois critérios, complementados pelo teste de Tukey para determinação do ponto de saturação, e pelo teste de Sidak para identificação das diferenças entre as espessuras. A análise das diferenças estatísticas entre os valores de  $\Delta E$  dos protocolos experimentais com o gel contendo 10% de  $H_2O_2$  com os controles 35% 3x15 S2 (Grupo ICI) e 35% 1x15 S5 (Grupo PMS) foram realizadas pelo teste de ANOVA a um critério, complementado pelo teste de Dunnett. Todos os testes foram fixados a um nível de significância de 5%.

## 5 RESULTADO

### 5.1 Viabilidade Celular

Considerando-se o grupo controle negativo (sem tratamento clareador) como 100% de viabilidade celular, os seguintes valores de viabilidade celular foram obtidos para os protocolos 35% 3x15, 10% 3x15, 10% 1x15 e 10% 1x5, respectivamente: Grupo ICI - 8,5%, 37,6%, 86,0% e 107,8%, em 0 horas, e 12,0%, 59,5%, 170,2% e 270,3% em 72 horas; Grupo PMS - 15,3%, 71,0% 127,2% e 120,1%, em 0 horas, e 22,4%, 159,8%, 252,0% e 267,3% em 72 horas. A viabilidade celular no controle negativo em 72 horas para os Grupos ICI e PMS foi de 226,9% e 270%, respectivamente. De acordo com o gráfico demonstrado na Figura 7, apenas os protocolos 35% 3x15 e 10% 3x15 nos Grupos ICI e PMS apresentaram valores de viabilidade celular significativamente inferiores ao controle negativo. Todavia, os valores de viabilidade celular obtidos para o protocolo tradicional (35% 3x15), em ambas as espessuras, foram significativamente menores que aqueles obtidos para os protocolos experimentais com o gel contendo 10% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Quando cada protocolo foi comparado entre os períodos 0 e 72 horas, ausência de aumento significativo na viabilidade celular em 72 horas foi observado para os protocolos 35% 3x15 e 10% 3x15 para o Grupo ICI, e apenas para o protocolo 35% 3x15 para o Grupo PMS. Em relação ao efeito da espessura de esmalte/dentina nos valores de viabilidade celular para cada protocolo de clareamento, observou-se que as células expostas aos géis com 10 e 35% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aplicados por 3x15 minutos nos períodos de 0 e 72 horas no Grupo ICI apresentaram valores de viabilidade celular significativamente inferiores aqueles observados no Grupo PMS.

**Figura 7-** Viabilidade Celular. Gráfico de barras representativo da porcentagem de viabilidade celular obtidos pelo teste de MTT para os protocolos de clareamento nos períodos de 0 horas (T1) e 72 horas (T2), nos Grupos ICI e PMS. Letras minúsculas permitem comparações entre os protocolos de clareamento no período de 0 horas para cada espessura, separadamente; letras maiúsculas permitem comparações entre os protocolos de clareamento no período de 72 horas para cada espessura, separadamente; letras diferentes demonstram diferença significativa entre os protocolos de clareamento (Teste de Tukey;  $p < 0,05$ ). # e ★ indicam diferença significativa entre os períodos de análise (0 h x 72 h) para cada protocolo de clareamento nos Grupos ICI e PMS, respectivamente (Teste de Sidak;  $p < 0,05$ ). • e ° indicam diferença significativa entre as espessuras (Grupo ICI x Grupo PMS) para cada protocolo de clareamento nos períodos 0 horas e 72 horas, respectivamente (Teste de Sidak;  $p < 0,05$ ).

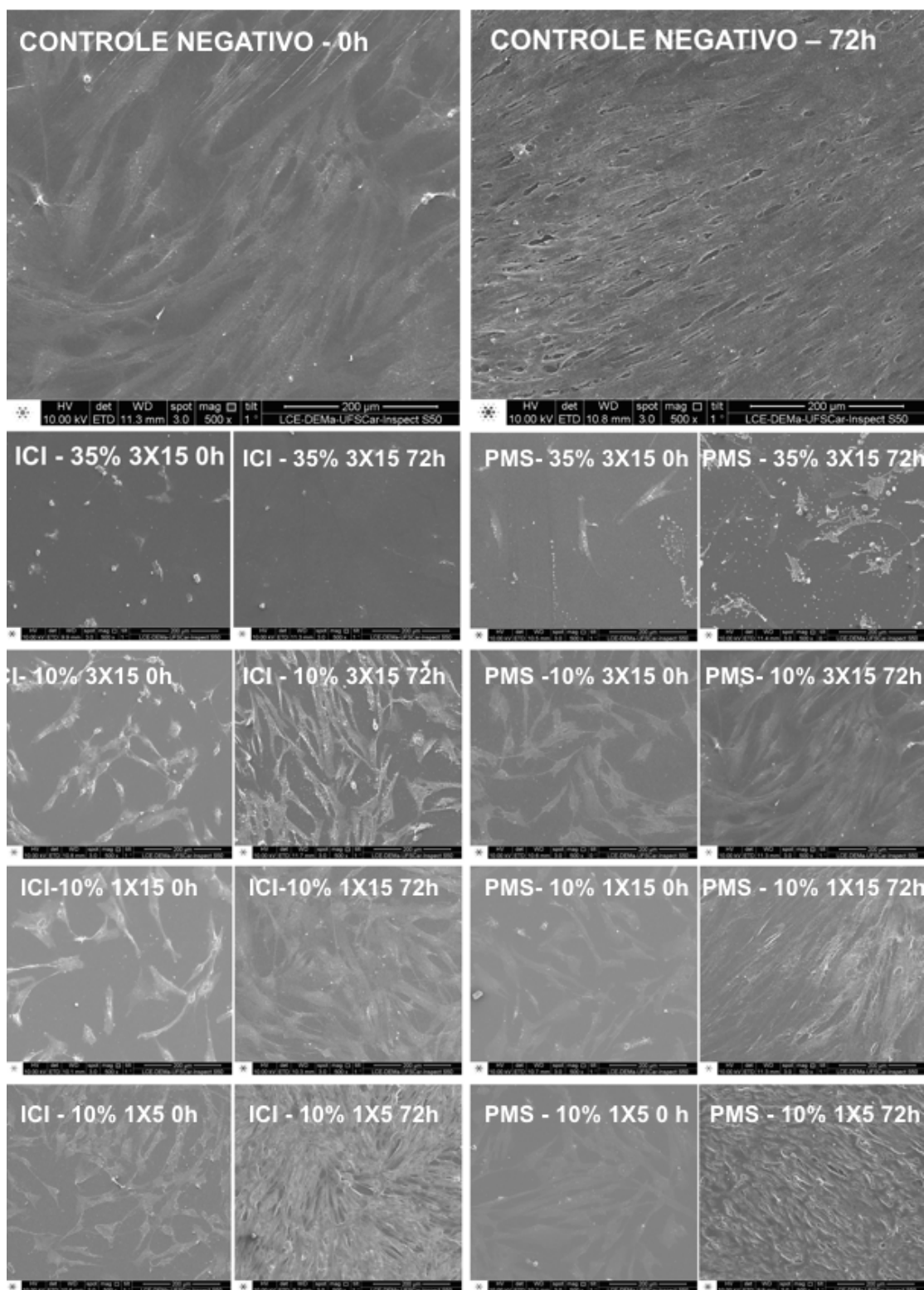


Fonte: Elaboração Própria

## 5.2 Morfologia Celular

A análise da morfologia celular por MEV (Figura 8) demonstrou que o protocolo tradicional promoveu intensa redução no número de células aderidas ao substrato do vidro nos Grupos ICI e PMS em 0 horas. As células que permaneceram aderidas apresentaram intensas alterações na morfologia celular. Discreto aumento no número de células em 72 horas foi observado apenas no Grupo PMS. Para o gel com 10% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, alterações na morfologia celular associada a redução no número de células aderidas em 0 horas foi observada para o protocolo 3x15 minutos; no entanto aumento no número de células foi observado em 72 horas. Discreta redução no número de células aderidas à lamínula de vidro imediatamente após o clareamento foi observada para o protocolo 1x15 minutos no Grupo ICI, e para o protocolo 3x15 minutos no Grupo PMS, sendo que as células apresentaram morfologia similar ao controle negativo em 0 horas quando avaliadas no período 72 horas pós-clareamento. Padrão morfológico similar ao controle negativo em 0 e 72 horas foi observado para os demais protocolos.

**Figura 8-** MEV 500x. Pannel de imagens representativas obtidas por MEV dos grupos controle e clareados nos períodos 0 h (T1) e 72 h (T2).

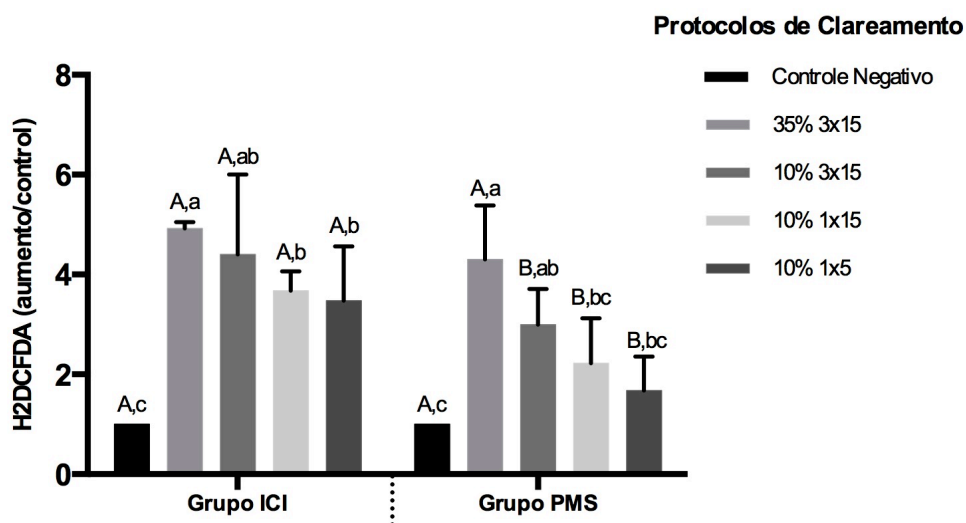


Fonte: Elaboração Própria

### 5.3 Estresse Oxidativo

De acordo com os resultados demonstrados na Figura 9, as células expostas aos extratos de todos os grupos clareados apresentaram intensidade de fluorescência para a sonda carboxy-H<sub>2</sub>DCFDA superiores ao controle negativo, o que denota que as mesmas se apresentaram em estresse oxidativo. Os maiores valores de intensidade de fluorescência foram observados para o protocolo tradicional em ambas as espessuras. Para o Grupo ICI, valores significativamente inferiores do que o protocolo tradicional foram observados apenas para os protocolos 10% 1x15 e 1x5 minutos. No entanto, para o Grupo PMS, todos os protocolos realizados com o gel contendo 10% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> promoveram estresse oxidativo menos intenso que o protocolo tradicional. Ainda, os valores de intensidade de fluorescência obtidos para os protocolos com o gel menos concentrado foram significativamente inferiores no Grupo PMS quando comparados com o Grupo ICI. Ausência de diferença significativa com o grupo controle negativo foi observado para os protocolos 10% 1x15 e 1x5 no Grupo PMS.

**Figura 9** - Mensuração do estresse oxidativo. Gráfico de barras representativo dos valores de fluorescência da sonda carboxy-H<sub>2</sub>DCFDA nos grupos controle e clareados, normalizados pelos valores médios obtidos no grupo controle negativo. Letras minúsculas permitem comparações entre os protocolos de clareamento para cada espessura (Teste de Tukey); letras maiúsculas permitem comparações entre as espessuras (Grupo ICI x Grupo PMS), para cada protocolo de clareamento (Teste de Sidak). Letras diferentes demonstram diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ).

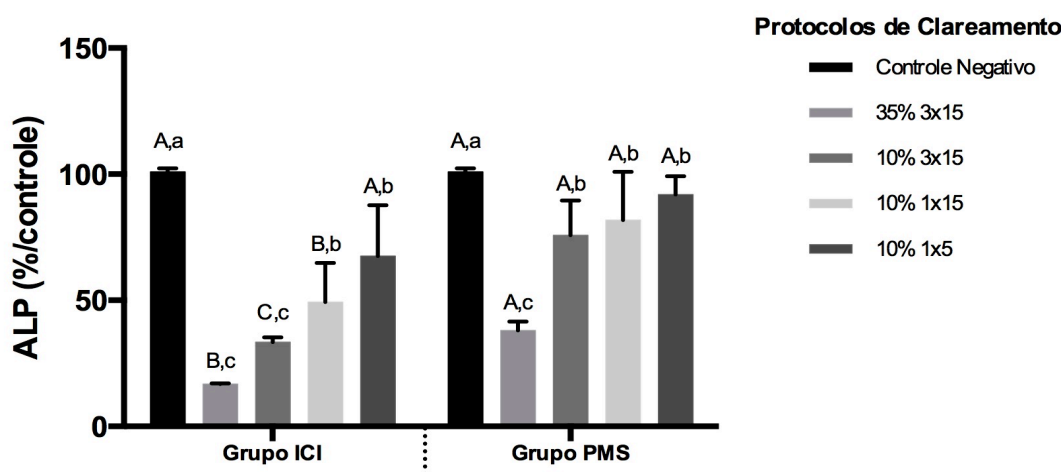


Fonte: Elaboração Própria

#### 5.4 Atividade de ALP/ Nódulos de Mineralização

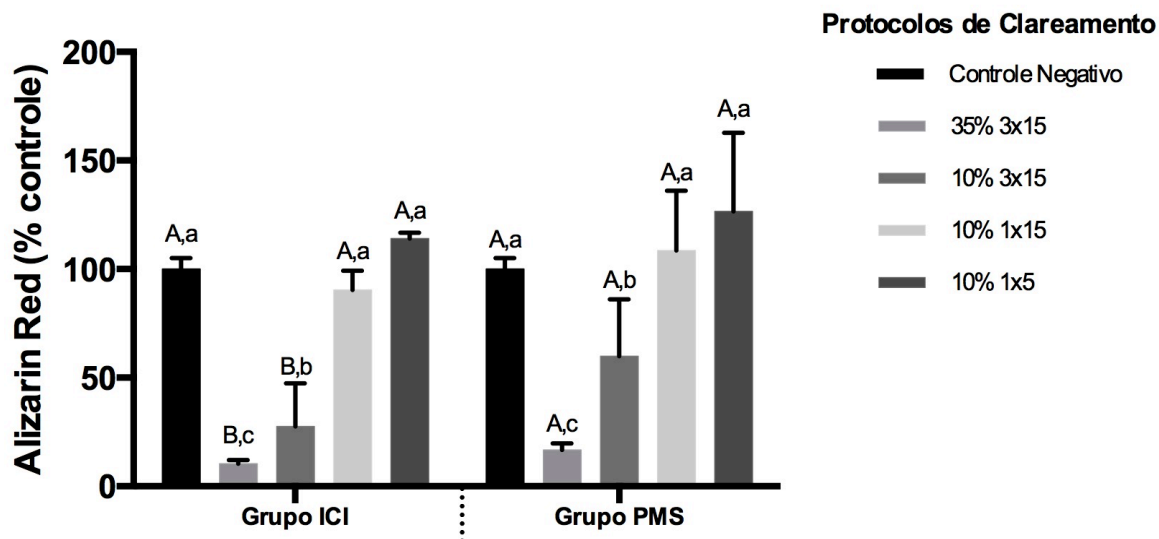
Com o objetivo de avaliar o potencial regenerativo das células pulpares após exposição aos extratos, e o efeito da espessura de esmalte/dentina a atividade de ALP e a deposição de nódulos de mineralização foram avaliados 14 e 21 dias pós-clareamento, respectivamente. O protocolo 35% 3x15 causou intensa redução na atividade de ALP em ambas as espessuras em relação ao grupo controle negativo (Figura 10); no entanto, redução significativa neste parâmetro celular em relação ao controle negativo também foi observado para todos os protocolos realizados com o gel contendo 10% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Apenas o protocolo 10% 3x15 no Grupo ICI não apresentou diferença com o protocolo tradicional. Diferença significativa entre as espessuras (ICI x PMS) foi observada para os protocolos 35% 3x15, 10% 3x15 e 10% 1x15. Resultados similares foram encontrados para o teste de Alizarin Red (Figura 11), onde os protocolos 35% e 10% 3x15 promoveram redução mais intensa na deposição de nódulos de mineralização no Grupo ICI. Para este teste, os protocolos 10% 1x15 e 1x5 não causaram alterações significativas em relação ao controle negativo, para ambas as espessuras.

**Figura 10** - Atividade de ALP. Gráfico de barras representativo da porcentagem de atividade de ALP nos grupos controle e clareados. Letras minúsculas permitem comparações entre os protocolos de clareamento para cada espessura (Teste de Tukey); letras maiúsculas permitem comparações entre as espessuras (Grupo ICI x Grupo PMS), para cada protocolo de clareamento (Teste de Sidak). Letras diferentes demonstram diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ).



Fonte: Elaboração Própria

**Figura 11-** Teste de Alizarin Red. Gráfico de barras representativo da porcentagem de coloração para Alizarin Red nos grupos controle e clareados. Letras minúsculas permitem comparações entre os protocolos de clareamento para cada espessura (Teste de Tukey); letras maiúsculas permitem comparações entre as espessuras (Grupo ICI x Grupo PMS), para cada protocolo de clareamento (Teste de Sidak). Letras diferentes demonstram diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ).

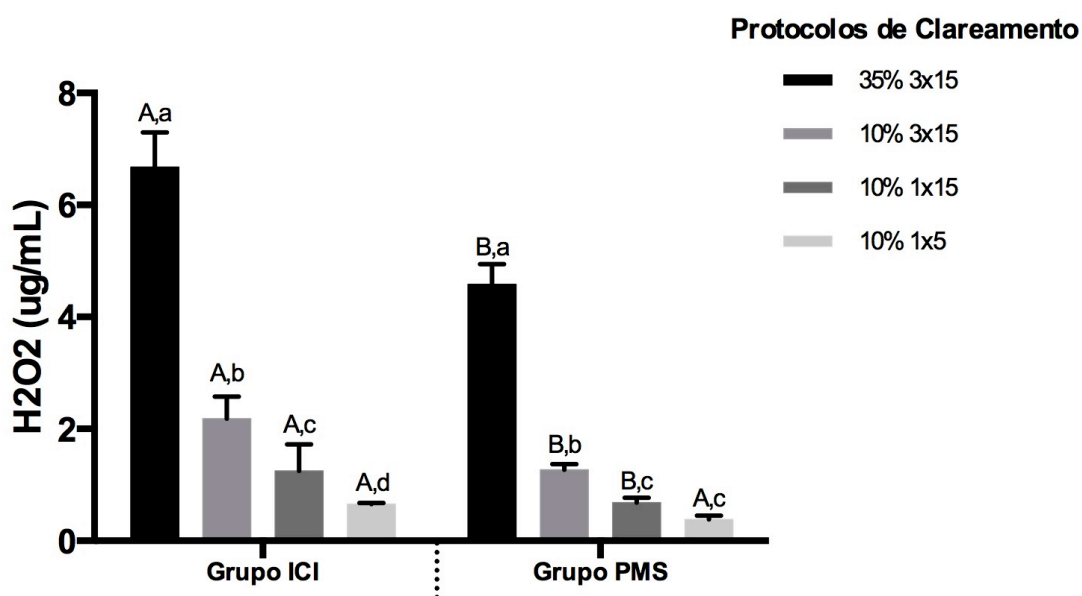


Fonte: Elaboração Própria

## 5.5 Quantificação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nos Extratos

Os resultados da quantificação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nos extratos estão demonstrados na Figura 12. Os maiores valores de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foram encontrados no meio de cultura após aplicação do gel com 35% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 3x15 minutos em ambas as espessuras; no entanto, os valores encontrados no Grupo PMS foram significativamente inferiores aqueles detectados no Grupo ICI para este protocolo. Em ambas as espessuras, a difusão de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi proporcional ao tempo de contato do gel com 10% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Difusão significativamente mais intensa no Grupo ICI em relação ao Grupo PMS foi observada para os protocolos 10% 3x15 e 1x15. Ausência de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi detectada no grupo controle negativo, sendo este desconsiderado na análise estatística.

**Figura 12-** Quantificação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Gráfico de barras representativo do total de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> presente nos extratos nos grupos clareados. Letras minúsculas permitem comparações entre os protocolos de clareamento para cada espessura (Teste de Tukey); letras maiúsculas permitem comparações entre as espessuras (Grupo ICI x Grupo PMS), para cada protocolo de clareamento (Teste de Sidak). Letras diferentes demonstram diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ).

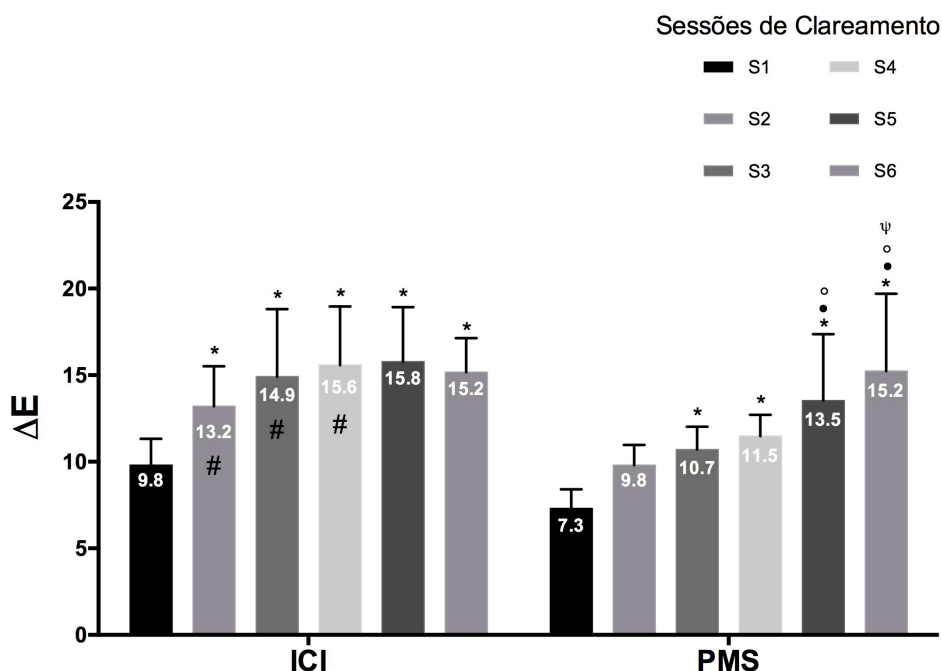


Fonte: Elaboração Própria

## 5.6 Alteração de Cor

Inicialmente, os dados de  $\Delta E$  obtidos durante as 6 sessões de clareamento para o protocolo tradicional nos Grupos ICI e PMS foram analisados, de forma a determinar o ponto de saturação. De acordo com a Figura 13, é possível observar que os espécimes atingiram saturação na alteração de cor após a segunda e quinta sessões para os Grupos ICI e PMS, respectivamente, visto que não foi observada diferença significativa entre as sessões seguintes a partir deste ponto. Desta forma, o valor de  $\Delta E$  para o protocolo 35% 3x15 na sessão 2 (S2) e na sessão 5 (S5) foram empregados como controle positivo nos Grupos ICI e PMS, respectivamente, para as análises subsequentes.

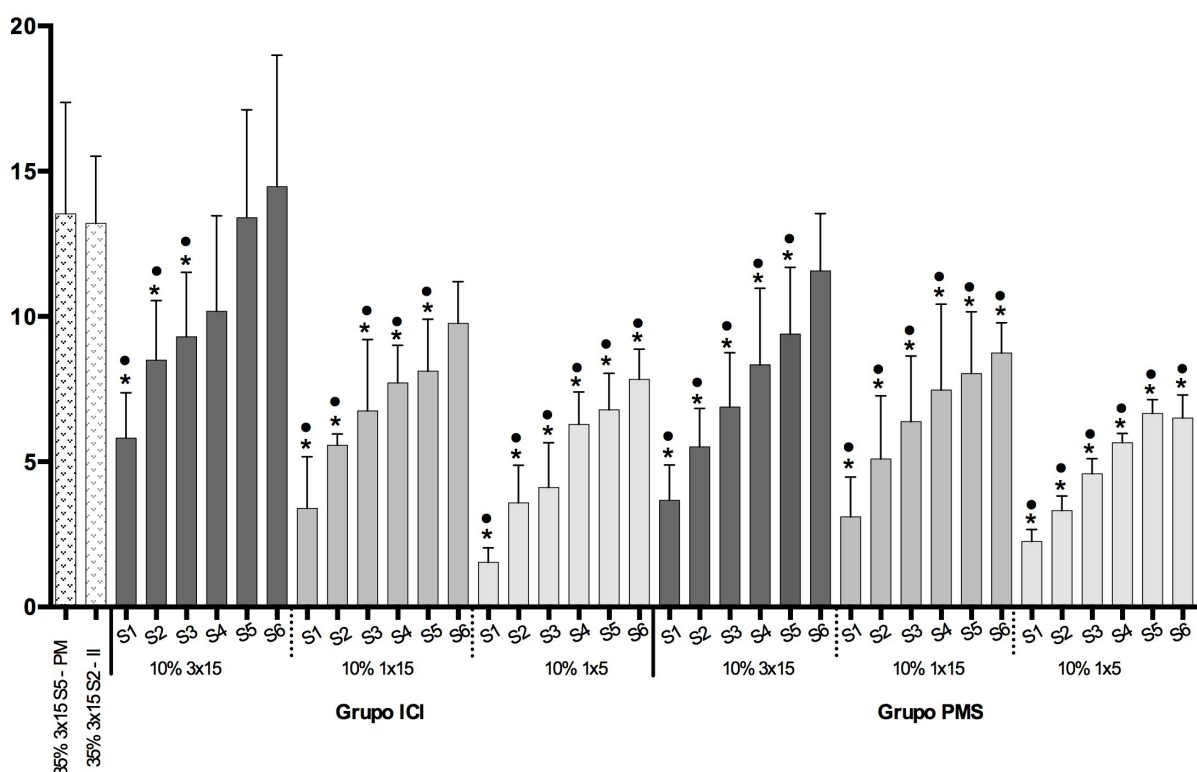
**Figura 13-** Determinação do ponto de saturação para protocolo 35% 3x15. Gráfico de barras representativo dos valores de  $\Delta E$  obtidos para o protocolo 35% 3x15 em cada sessão de clareamento (S1 a S6), para ambas as espessuras. \* indica diferença significativa com S1; • indica diferença significativa com S2; ° indica diferença significativa com S3;  $\psi$  indica diferença significativa com S4 (Teste de Tukey;  $p < 0,05$ ) # indica diferença significativa entre os Grupos ICI e PMS em cada sessão de clareamento (Teste de Sidak;  $p < 0.05$ ).



Fonte: Elaboração Própria

De forma a determinar o número de sessões clareadoras para cada protocolo experimental com o gel contendo 10%  $H_2O_2$  capaz de promover eficácia clareadora estatisticamente similar ao protocolo tradicional no ponto de saturação, os valores de  $\Delta E$  para cada protocolo experimental, dentro de cada sessão de clareamento, foram comparados com os controles positivos previamente estabelecidos (Figura 14). De acordo com esta análise, ausência de diferença significativa com ambos controles positivos (Grupos ICI e PMS) foi observada para os seguintes protocolos: 1) Grupo ICI: 10% 3x15 nas sessões 4, 5 e 6; 10% 1x5 na sessão 6; 2) Grupo PMS: 10% 3x15 na sessão 6. Neste experimento, discos do Grupo ICI e PMS não-clareados foram empregados como controle negativo, os quais foram avaliados durante as seis sessões clareadoras, sendo observada ausência de alteração significativa entre os valores de  $\Delta E$  em todos os períodos de análise, validando a metodologia empregada.

**Figura 14-** Análise do potencial de clareamento. Gráfico de barras representativo dos valores de  $\Delta E$  obtidos para os controles positivos no ponto de saturação e para os protocolos experimentais nas sessões clareadoras (S1 a S6). \* indica diferença significativa com 35% 3x15 S5 - PMS; • indica diferença significativa com 35% 3x15 S2 - ICI (Teste de Sidak;  $p < 0,05$ ).



Fonte: Elaboração Própria

## 6 DISCUSSÃO

Com a proposta de determinar a influência da espessura de esmalte e dentina sobre a citotoxicidade e eficácia clareadora de um gel experimental contendo 10% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, discos de esmalte/dentina, simulando a espessura de incisivos inferiores (2,3 ± 0,2 mm) e pré-molares (4,0 ± 0,2 mm) humanos, foram submetidos a diferentes protocolos de aplicação, sendo os dados obtidos comparados com a terapia tradicionalmente empregada em consultório (35% 3x15). Como demonstrado previamente na literatura, o protocolo tradicional envolvendo a aplicação de um gel com 35% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 3x15 minutos resultou em intensa redução da viabilidade das células pulpares humanas, associado a importantes alterações na morfologia celular. As maiores concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no extrato foram detectadas para este protocolo, sendo este fenômeno proporcional a espessura dental. Esses resultados demonstram que uma grande quantidade de moléculas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> não reagidas é capaz de se difundir pela estrutura dental durante o uso de géis clareadores com elevadas concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. O efeito tóxico em consequência a este efeito adverso tem sido correlacionado com o desenvolvimento de uma condição de estresse oxidativo nas células pulpares, levando ao processo de morte celular por necrose decorrente de uma desestruturação da membrana celular (Soares et al.<sup>50</sup>, 2014; Soares et al.<sup>54</sup>, 2015). Os maiores valores de intensidade de fluorescência para a sonda carboxy-H<sub>2</sub>DCFDA também foram encontrados para este protocolo clareador no presente estudo, confirmando que a redução da viabilidade celular mediada por agentes clareadores está diretamente relacionada ao estabelecimento de uma condição de intenso estresse oxidativo. Em períodos de análise tardios (72 horas pós-clareamento), também foi possível observar que as células expostas aos extratos provenientes da terapia tradicional apresentaram limitado potencial proliferativo, visto que ausência de diferença significativa entre os valores de viabilidade celular nos períodos 0 e 72 horas foi observada para ambas as espessuras testadas.

O estabelecimento da condição de estresse oxidativo no tecido pulpar tem sido considerado como fator desencadeante de uma reação inflamatória tecidual aguda in vivo (De Souza Costa et al.<sup>20</sup>, 2010; Cintra et al.<sup>12</sup>, 2012; Roderjan et al.<sup>42</sup>, 2014; Roderjan et al.<sup>43</sup>, 2015), com consequente expressão de proteases teciduais e degradação da matriz extracelular (Sato et al.<sup>45</sup>, 2013), levando à condição de

necrose tecidual. Ainda, o processo de morte celular por necrose resulta em liberação de enzimas lisossomais e outros componentes intracelulares, os quais, em conjunto, causam danos teciduais extensos (Cooper et al.<sup>14</sup>, 2010; Cooper et al.<sup>15</sup>, 2014), tal como demonstrado nos incisivos inferiores submetidos ao clareamento de consultório tradicional. Desta forma, podemos considerar a aplicação de protocolo de clareamento tradicional em dentes com pequena espessura de esmalte/dentina constitui-se em uma terapia com elevado risco para o estabelecimento de danos extensivos e irreversíveis para o complexo dentino-pulpar, visto que estes permitem intensa difusão de  $H_2O_2$  e seus produtos de degradação em direção à câmara pulpar.

Todos os protocolos experimentais avaliados no presente estudo para o gel com 10% de  $H_2O_2$  resultaram em difusão trans-amelodentinária de peróxido, a qual foi diretamente relacionada ao tempo de contato do produto com a estrutura dental, bem como com a espessura de esmalte/dentina do substrato dentário. No entanto, ficou constatado que este fenômeno foi cerca de 3 a 12 vezes menos intenso do que o observado para o protocolo 35% 3x15 minutos. Esta minimização no total de  $H_2O_2$  residual foi associada aos valores de viabilidade celular, significativamente superiores aqueles detectados para o protocolo tradicional, encontrados para todos os protocolos experimentais com o gel com 10% de  $H_2O_2$ . Em ambas as espessuras simuladas, redução significativa na viabilidade celular em comparação ao controle não-clareado foi encontrada apenas quando o gel com 10% de  $H_2O_2$  foi aplicado por 3x15 minutos. Este protocolo induziu uma condição de estresse oxidativo associado à redução na viabilidade celular mais intenso no Grupo ICI, demonstrando que a espessura do substrato dental apresentou papel fundamental a toxicidade mediada por este protocolo clareador. Diferenças na morfologia celular relacionadas à espessura dental para este protocolo também foram constatadas na análise por MEV. O Grupo ICI apresentou redução no número de células aderidas associado a alterações morfológicas mais intensas do que o Grupo PMS em 0 horas. No período de 72 horas, apenas as células do Grupo PMS apresentaram aumento significativo na viabilidade celular, a qual foi associada a parâmetros morfológicos similares ao grupo controle negativo em T1.

Quando o tempo de contato do gel com 10%  $H_2O_2$  foi reduzido para 15 ou 5 minutos, ausência de redução significativa na viabilidade celular em comparação ao controle negativo foi observado para ambas as espessuras. Leve redução na

viabilidade celular (em torno de 14%) foi observada apenas no protocolo 1x15 minutos no Grupo ICI, associada a redução sutil no número de células imediatamente após o clareamento na análise por MEV. Estresse oxidativo foi detectado para estes protocolos (1x15 e 1x5 minutos) no Grupo ICI, enquanto que ausência de diferença significativa com o controle negativo foi observado para este parâmetro celular quando estes protocolos foram realizados no Grupo PMS. Estes resultados corroboram os achados de um estudo prévio, onde observou-se que a aplicação de géis com 8 ou 10% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 3x15 minutos sobre a superfície de discos de esmalte/dentina com 3,5 mm de espessura resultou em redução de 72,7% e 59,7 % na viabilidade celular, respectivamente, imediatamente após o clareamento. Os autores também constataram que a redução na viabilidade celular foi cerca de 2,3 a 1,5 vezes menos intensa quando os mesmos produtos foram aplicados por 15 minutos sobre a superfície dental, sendo valores de viabilidade celular acima de 100% observados três dias após o clareamento (Soares et al.<sup>53</sup>, 2015). Desta forma, os resultados coletados na presente investigação demonstram que a espessura de esmalte/dentina do substrato dental apresenta relação direta com o total de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> capaz de se difundir em direção à câmara pulpar, o que pode estar diretamente relacionado aos maiores índices de sensibilidade dental observados em dentes anteriores nos ensaios clínicos.

O efeito da espessura dental sobre a resposta do tecido pulpar de dentes humanos frente ao clareamento foi previamente demonstrado em estudos histopatológicos. De Souza Costa et al.<sup>20</sup> (2010) observaram que quando um gel com 38% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi aplicado por 3x15 minutos sobre incisivos inferiores hígidos de pacientes jovens (espessura de dentina = 1,82 ± 0,08 mm), reação inflamatória intensa, associada a necrose superficial foram observados em cerca de 75% das amostras, enquanto que o tecido pulpar de pré-molares jovens (espessura de dentina = 3,10 ± 0,11 mm), submetidos à mesma terapia clareadora, apresentaram características histopatológicas similares aos dentes não clareados. Neste experimento, a sensibilidade dental foi relatada apenas nos incisivos inferiores clareados. Em outra investigação realizada recentemente, avaliou-se o efeito do protocolo tradicional (35% 3x15 minutos) sobre o tecido pulpar de incisivos inferiores de pacientes jovens (20,1 ± 4,3 anos) e idosos (58,2 ± 4,3 anos). Necrose tecidual foi detectada em cerca de 60% dos incisivos de indivíduos idosos, cuja espessura média de dentina foi de 1,99 ± 0.10 mm, em comparação com 100% dos incisivos

inferiores de pacientes jovens, os quais apresentaram espessura dentinária em média de  $1,77 \pm 0,08$  mm, sendo que a extensão da área de necrose foi consideravelmente maior nos dentes provenientes dos indivíduos jovens (Roderjanet al.<sup>42</sup>, 2014).

Com o objetivo de avaliar o potencial regenerativo das HDPCs em períodos pós-clareamento, foi avaliada a expressão de dois marcadores representativos da diferenciação odontogênica em células pulpares: atividade de ALP e deposição de nódulos de mineralização (Goldberg et al.<sup>23</sup>, 2010). De acordo com estudos prévios *in vitro*, a indução de intenso estresse oxidativo nas células pulpares humanas, mediado pelo  $H_2O_2$ , resulta em redução na expressão gênica de marcadores odontogênicos, tais como ALP, DSPP (sialofosfoproteína dentinária) e DMP-1 (proteína da matriz dentinária 1), os quais foram associados a intensa redução na deposição de matriz mineralizada (Lee et al.<sup>29</sup>, 2013; Soares et al.<sup>49</sup>, 2013; Soares et al.<sup>54</sup>, 2015; Soares et al.<sup>55</sup>, 2015). Por outro lado, concentrações não tóxicas de  $H_2O_2$  foram capazes de aumentar a expressão gênica de ALP, DSPP e DMP-1 (Lee et al.<sup>28</sup>, 2006; Min et al.<sup>35</sup>, 2008; Matsui et al.<sup>34</sup>, 2009; Soares et al.<sup>49</sup>, 2013). Desta forma, quanto menor a concentração de  $H_2O_2$  em contato com o tecido pulpar durante o clareamento, maior a capacidade regenerativa do tecido pulpar. Conforme esperado, a atividade de ALP e deposição de nódulos de mineralização foram drasticamente reduzidos nas células expostas ao protocolo tradicional, sendo que as células expostas aos extratos proveniente do Grupo ICI apresentaram valores significativamente inferiores aqueles obtidos no Grupo PMS. De uma forma geral, a expressão destes marcadores foi mais intensa nos grupos clareados com o gel contendo 10% de  $H_2O_2$  em relação à terapia tradicional, e proporcional ao tempo de contato e à espessura de esmalte/dentina dos discos.

A atividade de ALP foi afetada negativamente em relação ao controle negativo para todos os protocolos experimentais na análise realizada 14 dias após exposição aos extratos. No entanto, aos 21 dias pós-clareamento, redução na deposição de nódulos de mineralização foi observada apenas para o protocolo 35% 3x15. Os protocolos 10% 1x5 no Grupo ICI, e os protocolos 10% 1x15 e 1x5 no Grupo PMS apresentaram deposição de matriz mineralizada superior aquela observada para o controle negativo, de forma similar ao observado para a viabilidade celular. Estudos prévios demonstraram que em baixas concentrações, o  $H_2O_2$  é capaz de induzir a expressão de proteínas relacionadas à deposição de

mineralização de matriz dentinária por células pulpares, levando a aumento na deposição de nódulos de mineralização *in vitro*. Estes efeitos positivos foram associados com um estresse oxidativo de baixa intensidade induzido pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Pode-se concluir que as células pulpares humanas são capazes de regular o estresse oxidativo de baixa intensidade, o que resulta em aumento na sua taxa de proliferação e na modulação da atividade secretória.

Tem sido demonstrado que a eficácia clareadora do clareamento dental pode ser comprometida em quando géis com baixas concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> são empregados (Soares et al.<sup>51</sup>, 2014). Em estudo realizado por Sulieman et al.<sup>59</sup> (2004), observou-se que géis com 25%, 15%, 10% e 5% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foram capazes de atingir o mesmo padrão de clareamento (B1 escala VITA) obtido pelo gel com 35% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pelo aumento no número de sessões clareadoras em terceiros molares extraídos. De forma a determinar o potencial clareador dos protocolos experimentais em relação à terapia tradicional na presente investigação, inicialmente foi determinado o ponto de saturação para o protocolo 35% 3x15 minutos. Dentro das condições experimentais do presente estudo, o ponto de saturação para o Grupo ICI foi obtido após duas sessões (S2 -  $\Delta E = 13,2$ ), e após 5 sessões (S2 -  $\Delta E = 13,5$ ) para o Grupo PMS. Desta forma, os valores de  $\Delta E$  obtidos em cada sessão clareadora (S1 a S6) para os protocolos experimentais com o gel contendo 10% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foram comparados com os valores de  $\Delta E$  do grupo 35% 3x15 minutos no ponto de saturação (controle positivo).

De acordo com os resultados, os protocolos 10% 3x15 e 1x15 minutos no Grupo ICI foram capazes de atingir o padrão de clareamento estatisticamente similar ao controle positivo após 4 e 6 sessões, respectivamente. No grupo PMS, um total de 6 sessões clareadoras foram necessárias para o protocolo 10% 3x15 minutos atingir este parâmetro. Estes dados demonstram que estes protocolos mais biocompatíveis são capazes de promover um clareamento tão efetivo quanto o protocolo convencional após a realização de algumas sessões adicionais, sendo esses resultados mais facilmente obtidos em dentes com pequena espessura de esmalte/dentina. Assim, o uso de géis clareadores com baixas concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> apresenta-se como uma alternativa interessante para o clareamento de consultório, sendo que estes podem ser direcionados para dentes pequenos, tal como incisivos inferiores, os quais são mais susceptíveis aos efeitos patológicos do clareamento dental.

É importante deixar claro que os resultados obtidos a partir de estudos *in vitro* não podem ser diretamente transportados para a condição *in vivo*, visto que diversos fatores, tais como pressão intra-pulpar, presença de componentes orgânicos dentro dos túbulos dentinários, bem como presença de uma matriz extracelular, minimizam efetivamente o efeito negativo de géis clareadores no tecido pulpar. De acordo com os estudos histopatológicos previamente discutidos, a terapia tradicional não promoveu danos em pré-molares humanos (Kina et al.<sup>26</sup>, 2010; De Souza Costa et al.<sup>20</sup>, 2010), enquanto que na presente investigação este protocolo promoveu intensos efeitos tóxicos sobre as HDPCs, mesmo quando aplicado sobre os discos simulando a espessura de pré-molares. Ainda, a análise da eficácia clareadora foi realizada sobre discos simulando intensa coloração intrínseca, com o objetivo de representar uma situação desafiadora (Sulieman et al.<sup>59</sup>, 2004). Desta forma, as evidências científicas obtidas na presente investigação para o gel com 10% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> podem ser consideradas animadoras. Assim, os protocolos de clareamento avaliados se apresentam como uma interessante alternativa para serem testados em futuras pesquisas clínicas, o que poderá resultar no desenvolvimento de terapias clareadoras de consultório esteticamente viáveis e biologicamente compatíveis com o complexo dentino-pulpar.

## 7 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos no presente estudo, podemos concluir que:

1) A espessura de esmalte e dentina apresentou relação direta com a difusão de  $H_2O_2$  pela estrutura dental e, conseqüentemente, com a citotoxicidade inicial e capacidade proliferativa/regenerativa tardia de células pulpares humanas;

2) O gel clareador com 10% de  $H_2O_2$  promoveu menor efeito tóxico trans-amelodentinário em comparação ao protocolo tradicional (35% 3x15 minutos);

3) A citotoxicidade do gel clareador com 10% de  $H_2O_2$  apresentou relação direta com o tempo de contato do produto com a superfície dental, sendo que sua aplicação por períodos reduzidos foi capaz de estimular o fenótipo odontoblástico das células pulpares humanas;

4) A aplicação do gel com 10% de  $H_2O_2$  por períodos de 3x15 ou 1x15 minutos sobre discos de esmalte/dentina, simulando incisivos inferiores, foi capaz de promover clareamento tão efetivo quanto aquele observado para o protocolo tradicional de consultório.

**REFERÊNCIAS\***

1. Almeida LC, Riehl H, Santos PH, Sundfeld ML, Briso AL. Clinical evaluation of the effectiveness of different bleaching therapies in vital teeth. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 2012; 32(3): 303-9.
2. Andersson DA, Gentry C, Moss S, Bevan S. Transient receptor potential A1 is a sensory receptor for multiple products of oxidative stress. *J Neurosci.* 2008; 28(10) 2485-94.
3. Bonafé E, Bacovis CL, Iensen S, Loguercio AD, Reis A, Kossatz S. Tooth sensitivity and efficacy of in-office bleaching in restored teeth. *J Dent.* 2013; 41(4): 363-9.
4. Bonafé E, Loguercio AD, Reis A, Kossatz S. Effectiveness of a desensitizing agent before in-office tooth bleaching in restored teeth. *Clin Oral Investig.* 2014;18(3): 839-45
5. Bortolatto JF, Pretel H, Floros MC, Luizzi AC, Dantas AA, Fernandez E, et al. Low concentration H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/TiON in office bleaching: a randomized clinical trial. *J Dent Res.* 2014; 93(7 Suppl): 66S-71S.
6. Boushell LW, Ritter AV, Garland GE, Tiwana KK, Smith LR, Broome A, et al. Night guard vital bleaching: side effects and patient satisfaction 10 to 17 years post-treatment. *J Esthet Restor Dent.* 2012; 24(3): 211-9.
7. Briso ALF, Fonseca MSM, Almeida LCAG, Mauro SJ, Santos PH. Color Alteration in teeth subjected to different bleaching techniques. *Laser Phys,* 2010; 20(12): 2066-9.
8. Briso AL, Gonçalves RS, Costa FB, Gallinari Mde O, Cintra LT, Santos PH. Demineralization and hydrogen peroxide penetration in teeth with incipient lesions. *Braz Dent J.* 2015; 26(2):135-40.
9. Camargo SEA, Valera MC, Camargo CHR, Mancini MNG, Menezes MM. Penetration of 38% hydrogen peroxide into the pulp chamber in bovine and human teeth submitted to office bleach technique. *J Endod.* 2007; 33(9): 1074-7.
10. Carey CM. Tooth whitening: what we now know. *J Evid Based Dent Pract.* 2014; 14 Suppl: 70-6.
11. Cecarini V, Gee J, Fioretti E, Amici M, Angeletti M, Eleuteri AM, et al. Protein oxidation and cellular homeostasis: Emphasis on metabolism. *Biochim Biophys Acta.* 2007 ; 1773(2): 93-104
12. Cintra LT, Benetti F, da Silva Facundo AC. The number of bleaching sessions influences pulp tissue damage in rat teeth. *J Endod.* 2013; 39(12): 1576-80.

\* De acordo com o manual da FOAr/UNESP, adaptadas das normas Vancouver. Disponível no site: <http://www.foar.unesp.br/#!/biblioteca/manual>

13. Coldebella CR, Ribeiro AP, Sacono NT, Trindade FZ, Hebling J, de Souza Costa CA. Indirect cytotoxicity of a 35% hydrogen peroxide bleaching gel on cultured odontoblast-like cells. *Braz Dent J.* 2009; 20(4): 267-74.
14. Cooper PR, Takahashi Y, Graham LW, Simon S, Imazato S, Smith AJ. Inflammation-regeneration interplay in the dentine-pulp complex. *J Dent.* 2010; 38(9): 687-97.
15. Cooper PR, Holder MJ, Smith AJ. Inflammation and regeneration in the dentin-pulp complex: a double-edged sword. *J Endod.* 2014; 40(4Suppl): S46-51
16. De Almeida LC, de Souza Costa CA, Riehl H, dos Santos PH, Sundfeld RH, Briso AL. Occurrence of sensitivity during at-home and in-office tooth bleaching therapies with or without use of light sources. *Acta Odontol Latinoam.* 2012; 25(1): 3-8.
17. De Almeida LC, Soares DG, Gallinari MO, de Souza Costa CA, Dos Santos PH, Briso AL. Color alteration, hydrogen peroxide diffusion, and cytotoxicity caused by in-office bleaching protocols. *Clin Oral Investig.* 2015; 19(3) 673-80.
18. De Almeida LC, Soares DG, Azevedo FA, Gallinari Mde O, de Souza Costa CA, Santos PH, et al. At-home bleaching: color alteration, hydrogen peroxide diffusion and cytotoxicity. *Braz Dent J.* 2015; 26(4): 378-83.
19. De Paula EA, Nava JA, Rosso C, Benazzi CM, Fernandes KT, Kossatz S, et al. In-office bleaching with a two- and seven-day intervals between clinical sessions: A randomized clinical trial on tooth sensitivity. *J Dent.* 2015; 43(4): 424-9.
20. De Souza Costa CA, Riehl H, Kina JF, Sacono NT, Hebling J. Human pulp responses to in-office tooth bleaching. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2010; 109(4): e59-64.
21. De Souza Costa CA, Hebling J, Scheffel DL, Soares DG, Basso FG, Ribeiro AP. Methods to evaluate and strategies to improve the biocompatibility of dental materials and operative techniques. *Dent Mater.* 2014; 30(7): 769-84.
22. Duque CC, Soares DG, Basso FG, Hebling J, de Souza Costa CA. Bleaching effectiveness, hydrogen peroxide diffusion, and cytotoxicity of a chemically activated bleaching gel. *Clin Oral Investig.* 2014;18(6): 1631-7.
23. Goldberg M, Grootveld M, Lynch E. Undersirable and adverse effects of tooth whitening products: a review. *Clin Oral Investig.* 2010;14(1): 1-10.
24. Gonçalves RS, de Souza Costa CA, Soares DG, Santos PD, Cintra L, Briso A. effect of different Light sources and enamel preconditioning on color change, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> penetration, and cytotoxicity in bleached teeth. *Oper Dent.* 2016; 41(1): 83-92.
25. Hand WL Jr. Enamel dentin thickness of young maxillary permanent incisors. *J N C Dent Soc.* 1968; 51(3): 30-6.

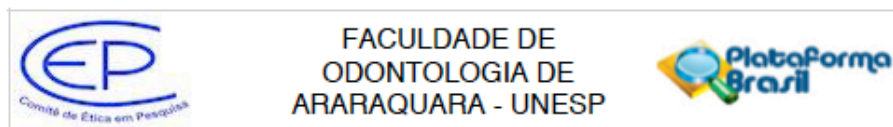
26. Kina JF, Huck C, Martinez TC, Sacono NT, Ribeiro APD, Costa CAS. Response of human pulps after professionally applied vital tooth bleaching. *Int Endod J.* 2010; 43(7): 572-80.
27. Kossatz S, Dalanhol AP, Cunha T, Loguercio A, Reis A. Effect of light activation on tooth sensitivity after in-office bleaching. *Oper Dent.* 2011; 36(3): 251-7.
28. Lee DH, Lim BS, Lee YK, Yang HC. Effects of hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) on alkaline phosphatase activity and matrix mineralization of odontoblast and osteoblast cell lines. *Cell Biol Toxicol* 2006; 22(1): 39-46.
29. Lee YH, Kang YM, Heo MJ, Kim GE, Bhattarai G, Lee NH, et al. The survival role of peroxisome proliferator-activated receptor gamma induces odontoblast differentiation against oxidative stress in human dental pulp cells. *J Endod.* 2013; 39(2): 236-41.
30. Lima AF, Ribeiro AP, Soares DG, Sacono NT, Hebling J, de Souza Costa CA. Toxic effects of daily applications of 10% carbamide peroxide on odontoblast-like MDPC-23 cells. *Acta Odontol Scand.* 2013; 71(5): 1319-25.
31. Markowitz K. Pretty painful: why does tooth bleaching hurt? *Med Hypotheses.* 2010; 74(5): 835-40.
32. Marson FC, Gonçalves RS, Silva CO, Cintra LT, Pascotto RC, Santos PH, et al. Penetration of hydrogen peroxide and degradation rate of different bleaching products. *Oper Dent.* 2015; 40(1) 72-9.
33. Martin J, Fernandez E, Bahamondes V, Werner A, Elphick K, Oliveira OB Jr., et al. Dentin hypersensitivity after teeth bleaching with in-office systems. Randomized clinical trial. *Am J Dent.* 2013; 26(1):10-4.
34. Matsui S, Takahashi C, Tsujimoto Y, Matsushima K. Stimulatory effects of low-concentration reactive oxygen species on calcification ability of human dental pulp cells. *J Endod.* 2009; 35(1): 67-72.
35. Min KS, Lee HJ, Kim SH, Lee SK, Kim HR, Pae HO. Hydrogen peroxide induces Heme Oxygenase-1 and dentin sialophosphoprotein mRNA in human pulp cells. *J Endod.* 2008; 34(8): 983-9.
36. Moncada G, Sepúlveda D, Elphick D, Contente M, Estay J, Bahamondes V, et al. Effects of light activation, agent concentration, and tooth thickness on dental sensitivity after bleaching. *Oper Dent.* 2013; 38(5): 467-76.
37. Mottola HA, Simpson BE, Gorin G. Absorptiometric determination of hydrogen peroxide in submicrogram amounts with leuco crystal violet and peroxidase as catalyst. *Anal Chem.* 1970; 42(3): 410-1
38. Özcan M, Abdin S, Sipahi C. Bleaching induced tooth sensitivity: do the existing enamel craze lines increase sensitivity? A clinical study. *Odontology.* 2014; 102(2):197-202.

39. Park CK, Kim MS, Fang Z, Li HY, Jung SJ, Choi SY, et al. Functional expression of thermo-transient receptor potential channels in dental primary afferent neurons: implication for tooth pain. *J Biol Chem.* 2006; 281(25):17304-11.
40. Reis A, Dalanhol AP, Cunha TS, Kossatz S, Loguercio AD. Assessment of tooth sensitivity using a desensitizer before light activated bleaching. *Oper Dent.* 2011; 36(1): 12-7.
41. Reis A, Tay LY, Herrera DR, Kossatz S, Loguercio AD. Clinical effects of prolonged application time of an in-office bleaching gel. *Oper Dent.* 2011; 36(6): 590-6.
42. Roderjan DA, Stanislawczuk R, Hebling J, de Souza Costa CA, Soares DG, Reis A, et al. Histopathological features of dental pulp tissue from bleached mandibular incisors *J Mater Sci Eng B.* 2014; B4(6B): 178-85.
43. Roderjan DA, Stanislawczuk R, Hebling J, de Souza Costa CA, Reis A, Loguercio AD. Response of human pulps to different in-office bleaching techniques: preliminary findings. *Braz Dent J.* 2015; 26(3): 242-8.
44. Rodrigues LM, Vansan LP, Pécora JD, Marchesan MA. Rodrigues LM, Vansan LP, et al. Permeability of different groups of maxillary teeth after 38% hydrogen peroxide internal bleaching. *Braz Dent J.* 2009; 20(4): 303-6.
45. Sato C, Rodrigues FA, Garcia DM, Vidal CM, Pashley DH, Tjäderhane L, et al.. Tooth bleaching increases dentinal protease activity. *J Dent Res.* 2013; 92(2): 187-92.
46. Sawada Y, Hosokawa H, Matsumura K, Kobayashi S. Activation of transient receptor potential ankyrin 1 by hydrogen peroxide. *Eur J Neurosci.* 2008;27(5):1131-42.
47. Shillingburg HT Jr, Grace CS. Thickness of enamel and dentin. *J South Calif Dent Assoc.* 1973; 41(1): 33-6.
48. Soares DG, Ribeiro AP, Sacono NT, Coldebella CR, Hebling J, de Souza Costa CA. Transenamel and transdentinal cytotoxicity of carbamide peroxide bleaching gels on odontoblast-like MDPC-23 cells. *Int Endod J.* 2011; 44(2): 116-25.
49. Soares DG, Ribeiro AP, da Silveira Vargas F, Hebling J, de Souza Costa CA. Efficacy and cytotoxicity of a bleaching gel after short application times on dental enamel. *Clin Oral Investig.* 2013;17(8): 1901-9.
50. Soares DG, Basso FG, Hebling J, de Souza Costa CA. Concentrations of and application protocols for hydrogen peroxide bleaching gels: effects on pulp cell viability and whitening efficacy. *J Dent.* 2014; 42(2): 185-98.
51. Soares DG, Basso FG, Pontes EC, Garcia Lda F, Hebling J, de Souza Costa CA. Effective tooth-bleaching protocols capable of reducing H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> diffusion through enamel and dentine. *J Dent.* 2014; 42(3): 351-8.

52. Soares DG, Sacono NT, Ribeiro AP, Basso FG, Scheffel DS, Hebling J, et al. Responses of dental pulp cells to a less invasive bleaching technique applied to adhesive-restored teeth. *J Adhes Dent*. 2015; 17(2): 155-61.
53. Soares DG, Basso FG, Hebling J, de Souza Costa CA. Immediate and late analysis of dental pulp stem cells viability after indirect exposition to alternative in-office bleaching strategies. *Clin Oral Investig*. 2015;19(5): 1013-20.
54. Soares DG, Gonçalves Basso F, Hebling J, de Souza Costa CA. Effect of hydrogen-peroxide-mediated oxidative stress on human dental pulp cells. *J Dent*. 2015; 43(6): 750-6.
55. Soares DG, Basso FG, Scheffel DS, Hebling J, de Souza Costa CA. Responses of human dental pulp cells after application of a low-concentration bleaching gel to enamel. *Arch Oral Biol*. 2015; 60(9): 1428-36
56. Soares DG, Hebling J, de Souza Costa CA. Human pulpal responses to peroxides. In: Perdigão J. *Tooth whitening — an evidence-based perspective..* Minnesota, USA: Springer; 2016. (In press).
57. Soares DG, Marcomini N, Basso FG, Pansani TN, Hebling J, de Souza Costa CA. Indirect cytocompatibility of a low-concentration hydrogen peroxide bleaching gel to odontoblast-like cells. *Int Endod J*. 2016; 49(1): 26-36
58. Stroud JL, Buschang PH, Goaz PW. Sexual dimorphism in mesiodistal dentin and enamel thickness. *Dentomaxillofac Radiol*. 1994; 23(3): 169-71.
59. Sulieman M, Addy M, MacDonald E, Rees JS. The effect of hydrogen peroxide concentration on the outcome of tooth whitening: an in vitro study. *J Dent*. 2004; 32(4): 295-9.
60. Sulieman M, Addy M, Rees JS. Surface and intra-pulpal temperature rises during tooth bleaching: an in vitro study. *Br Dent J*. 2005;199(1): 37-40.
61. Suty H, De Traversay C, Cost M. Applications of advanced oxidation processes: present and future. *Water Sci Technol*. 2004; 49(4): 227-33.
62. Tay LY, Kose C, Herrera DR, Reis A, Loguercio AD. Long-term efficacy of in-office and at-home bleaching: a 2-year double-blind randomized clinical trial. *Am J Dent*. 2012; 25(4): 199-204.
63. Trindade FZ, Ribeiro AP, Sacono NT, Oliveira CF, Lessa FC, Hebling J, et al. Trans-enamel and trans-dentinal cytotoxic effects of a 35% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bleaching gel on cultured odontoblast cell lines after consecutive applications. *Int Endod J*. 2009; 42(6): 516-24.
64. Ubaldini AL, Baesso ML, Medina Neto A, Sato F, Bento AC, Pascotto RC. Hydrogen peroxide diffusion dynamics in dental tissues. *J Dent Res*. 2013; 92(7): 661-5.

**ANEXO**

## Comprovante do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos

**COMPROVANTE DE ENVIO DO PROJETO****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** Eficácia clareadora e citotoxicidade de técnicas de clareamento experimentais de acordo com a espessura de esmalte e dentina do substrato dental

**Pesquisador:** Carlos Alberto de Souza Costa

**Versão:** 2

**CAAE:** 34387314.0.0000.5416

**Instituição Proponente:** Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP

**DADOS DO COMPROVANTE**

**Número do Comprovante:** 065563/2014

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

**Endereço:** HUMAITA 1680

**Bairro:** CENTRO

**UF:** SP

**Município:** ARARAQUARA

**CEP:** 14.801-903

**Telefone:** (16)3301-6459

**E-mail:** cep@foar.unesp.br

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

Araraquara, 23 de Março, de 2016

CARLA CAROLINE DE OLIVEIRA DUQUE