

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARAÇATUBA

LARISSA ÁLAMO

**Estudo *in vivo* do potencial anti-inflamatório do Otosporin
empregado em dentes de rato submetidos à clareação
dentária**

ARAÇATUBA-SP

2014

LARISSA ÁLAMO

**Estudo *in vivo* do potencial anti-inflamatório do Otosporin
empregado em dentes de rato submetidos à clareação
dentária**

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

Orientador: Prof. Dr. Luciano Tavares
Angelo Cintra

ARAÇATUBA-SP

2014

Dedicatória

Dedico este trabalho à Deus, à minha família, ao meu namorado, aos meus amigos, à todos os professores e, em especial, ao meu orientador e à Instituição por terem me dado todo amor, carinho, confiança, suporte e forças para superar as dificuldades.

Agradecimentos

À Deus;

aos meus pais: Adilson e Inês;

à minha irmã: Amanda;

aos meus avós: Neuza, Vicente e Benedita;

à todos os meus parentes;

ao meu namorado: Vitor;

à todos meus amigos e, em especial: Ana Caroline e Jessica;

à todos os professores e, em especial, ao meu orientador: Luciano;

à mestranda: Francine

à doutoranda: Luciana

à Instituição: Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP.

ÁLAMO, L. **Estudo in vivo do potencial anti-inflamatório do Otosporin empregado em dentes de rato submetidos à clareação dentária.** 2014. 32 f. Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2014.

Resumo

O Otosporin, medicamento indicado para o tratamento de otite externa, é também empregado em diversos procedimentos endodônticos tais como, capeamento, pulpotomia e como curativo de demora em casos de biopulpectomia. Apesar de amplamente estudado pela área médica e odontológica, ainda não foi explorado como agente anti-inflamatório pós-clareação dentária. Sabe-se que o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) contido no gel clareador pode causar danos à polpa dentária, que variam de inflamação à necrose pulpar. Assim, o objetivo deste estudo foi verificar o potencial anti-inflamatório do Otosporin em dentes submetidos à clareação dentária. Foram utilizados 20 ratos divididos em 4 grupos, contendo 10 hemi-maxilas cada. Os molares superiores direito de cada animal receberam o agente clareador, enquanto que os molares superiores esquerdo receberam o veículo do agente clareador. Metade dos animais recebeu a aplicação do Otosporin por 10 minutos sobre cada molar, e a outra metade, o veículo do Otosporin, formando os seguintes grupos: G1A- agente clareador seguido do Otosporin; G1B- veículo do agente clareador seguido do Otosporin; G2A- agente clareador seguido do veículo do Otosporin; G2B - veículo do agente clareador seguido do veículo do Otosporin. Após 2 dias, os animais foram eutanasiados e as maxilas processadas para avaliação em microscopia óptica. Os cortes teciduais foram corados em H.E., foram avaliados atribuindo-se escores ao critério infiltrado inflamatório. Os resultados foram submetidos à análise estatística, pelos testes de Kruskal Wallis e Dunn ($p < 0,05$). Os espécimes clareados que receberam a aplicação do Otosporin apresentaram infiltrado inflamatório leve no tecido pulpar na região de cornos pulpares, com diferença significativa em relação aos clareados que não receberam a aplicação do Otosporin, e que apresentaram infiltrado inflamatório severo à necrose nesta região. Conclui-se que o Otosporin, quando aplicado topicamente após procedimento clareador com H_2O_2 a 35% em molares de ratos Wistar, é capaz de minimizar o efeito citotóxico do agente clareador, reduzindo o processo inflamatório no tecido pulpar.

Palavras Chave: Clareação dentária. Otosporin. Inflamação pulpar.

ÁLAMO, L. *In vivo* anti-inflammatory potential of Otoporin employee in rat teeth submitted to dental bleaching. 2014. 32 f. Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2014.

Abstract

The Otoporin, drug indicated for the treatment of otitis externa, is also employed in various endodontic procedures such as capping, pulpotomy and as a root canal dressing in cases of biopulpectomia. Although widely studied by medical and dental field has not yet been explored as dental post-bleaching agent. It is known that the hydrogen peroxide (H₂O₂) of bleaching gel can cause biological effects to pulp tissue, that vary from inflammation to necrosis. The objective of this study is to assess the anti-inflammatory potential of Otoporin in teeth submitted to dental bleaching. 20 rats were divided into 4 groups of 10 hemi-maxilla each. Was held the application of agent bleaching in molars of the right hemi-maxilla, for 30 minutes of application. The molars of the left hemi-maxilla received the bleaching agent vehicle and served as control. . Half of the animals received application of Otoporin for 10 minutes in each molars. Other half received vehicle Otoporin, composed the following groups: G1A- bleaching agent followed by Otoporin; G1B- vehicle bleaching agent followed by Otoporin; G2A- bleaching agent followed the vehicle Otoporin; G2B- vehicle bleaching agent followed the vehicle Otoporin. After 2 days, the animals were euthanized and the jaws removed and processed for evaluation in optical microscopy. Tissue sections were stained with HE and evaluated by pre-established criteria by assigning scores to microscopic events. The results were analyzed statistically by the Kruskal Wallis and Dunn tests ($p < 0.05$). It was observed in cleared specimens where the Otoporin was used, the presence of mild inflammatory infiltrate, with a significant difference with the cleared that no received application of Otoporin and showed severe inflammatory infiltrate to necrosis in the coronal pulp. We conclude that the Otoporin when applied topically after bleaching procedure with H₂O₂ 35% in molars of Wistar rats is able to minimize the cytotoxic effect of bleaching agent, reducing the inflammatory process in the pulp tissue.

Keywords: Dental bleaching. Otoporin. Pulp inflammation.

Listas de figuras

Páginas

Figura 1. Cobaia anestesiada e posicionada com aplicação da barreira gengival e agente clareador nos molares superiores. 14

Figura 2. Visão aproximada dos molares superiores com aplicação da barreira gengival e gel clareador na sua fase inicial e final. 14

Figura 3. Divisão em terços da câmara pulpar 16

Figura 4. Imagem representativa do grupo G1A 17

Figura 5. Imagem representativa do grupo G1B 18

Figura 6. Imagem representativa do grupo G2A 19

Figura 7. Imagem representativa do grupo G2B 20

Lista de tabelas e quadros

Páginas

Tabela 1.	Divisão dos grupos	13
Quadro 1.	Escores atribuídos ao grupo clareado seguido da aplicação do Otosporin, de acordo com os terços da polpa coronária.	17
Quadro 2.	Escores atribuídos ao grupo em que foi utilizado o veículo do agente clareador seguido da aplicação do Otosporin, de acordo com os terços da polpa coronária.	18
Quadro 3.	Escores atribuídos ao grupo clareado seguido da aplicação do veículo do Otosporin, de acordo com os terços da polpa coronária.	19
Quadro 4.	Escores atribuídos ao grupo em que foi utilizado o veículo do agente clareador seguido da aplicação do veículo do Otosporin, de acordo com os terços da polpa coronária.	20
Tabela 2.	Cruzamentos entre os grupos para o terço oclusal da coroa dentária.	21
Tabela 3.	Cruzamentos entre os grupos para o terço médio da coroa dentária.	21

SUMÁRIO

	<i>Páginas</i>
1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	10
2. OBJETIVO	11
3. MATERIAL E MÉTODOS	12
4. RESULTADOS	17
5. DISCUSSÃO	23
6. CONCLUSÃO	26
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	27
ANEXO	32

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A clareação dentária tornou-se muito popular nos últimos anos devido ao apelo estético por dentes mais brancos, constituindo uma alternativa para pacientes que apresentam pigmentações dentárias (TEN BOSCH; COOPS, 1995). A preocupação em se clarear os dentes já era existente desde o antigo Egito, onde se utilizava abrasivos misturados ao vinagre para se alcançar tal objetivo (HIRATA *et al.*, 1997; PORTOLANI JÚNIOR; CANDIDO, 2005). Existem duas técnicas de clareação dentária para dentes vitais: a técnica de consultório e a técnica caseira. A técnica de consultório emprega o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em altas concentrações (20-38%) associado ou não a fontes de luz, sendo que a técnica caseira utiliza o peróxido de carbamida (6-22%), ou peróxido de hidrogênio em baixas concentrações (3-12%), associado a moldeiras de acetato (BUCHALLA *et al.*, 2007).

Independentemente do método utilizado para a clareação dentária de dentes vitais, todos tem como base o uso de H_2O_2 ou seu precursor, o peróxido de carbamida (BARGHI, 1998). O H_2O_2 sofre dissociação nas condições de uso clínico dando origem ao ânion peridroxila (HO_2^-), provável espécie ativa responsável pelo processo de clareação (KORYTOWSKI; SARNA, 1990). Goldstein *et al.* (1994), definem o mecanismo clareador como sendo uma reação de oxidação em que a substância a ser clareada doa elétrons ao agente clareador. Uma reação em cadeia leva à formação de radicais livres como o radical peridróxido e o ânion superóxido, sendo estes potentes agentes oxidantes. Estudos têm relatado a ocorrência de difusão do H_2O_2 pelo esmalte e dentina (BENETTI *et al.*, 2004; CAMPS *et al.*, 2007; 2010; CARRASCO-GUERISOLI *et al.*, 2009; HANNIG *et al.*, 2011), podendo atingir o complexo dentino-pulpar (COSTA *et al.*, 2010). Aproximadamente 52% dos pacientes que se submetem a este tipo de tratamento estético relatam sensibilidade dentária pós-operatória (HAYWOOD *et al.*, 1994).

Markowitz (2010) discutiu a relação da sensibilidade após clareação com outras formas de dor dentária. Embora a dor nos dentes clareados possa ser provocada por estímulos térmicos ou outros, a maioria dos pacientes se queixam de “formigamento” ou uma “agulhada” (HAYWOOD, 2005). Após a clareação, muitos pacientes descreveram dor como “pontadas” ou “choques” (CHARAKOR *et al.*, 2009). A dor após procedimentos clareadores também pode afetar dentes hígidos, ao contrário da sensibilidade comum, onde a dor ocorre em dentina exposta. Este quadro inflamatório pode estar diretamente ligado ao fato do H_2O_2 atingir o complexo dentino-pulpar. Histologicamente, podem ser observados

eventos inflamatórios de diversos graus no tecido pulpar de dentes submetidos a este procedimento estético (CINTRA *et al.*, 2013; CINTRA *et al.*, 2014; SEALE *et al.*, 1981), que já foram observados em dentes humanos (COSTA *et al.*, 2010). Sendo assim, o emprego de substâncias anti-inflamatórias pode ser uma medida promissora para minimizar os prejuízos que este procedimento estético pode causar.

O Otosporin, medicamento indicado para o tratamento de otite externa (SMITH; MOODIE, 1990) é também empregado em diversos procedimentos endodônticos tais como, capeamento (CANNON *et al.*, 2008), pulpotomia (PERCINOTO *et al.*, 2006) e como curativo de demora no interior dos canais radiculares em casos de biopulpectomia, quando por algum motivo não foi possível realizar o tratamento do canal radicular em uma única sessão (HOLLAND *et al.*, 1998; PANZARINI *et al.*, 2012). O Otosporin é constituído por uma associação de hidrocortisona com os antibióticos sulfato de polimixina B e sulfato de neomicina, apresentando ação antiinflamatória e antibiótica (SMITH; MOODIE, 1990). Devido a presença da hidrocortisona, o Otosporin também exerce atividade imunossupressora e vasoconstritora (HOLLAND *et al.*, 1998; PANZARINI *et al.*, 2012).

Alguns experimentos desenvolvidos em animais demonstraram que quando utilizado como medicação intracanal, o Otosporin preserva melhor a integridade do coto pulpar e tecidos periapicais (HOLLAND *et al.*, 1980), além de permitir a neoformação do coto pulpar quando este for destruído por uma sobre-instrumentação (DE SOUZA *et al.*, 1981; HOLLAND *et al.*, 1981). As vantagens do Otosporin e seu comportamento diferenciado, quando comparado com outros produtos que também podem ser utilizados como curativos de demora, está relacionado ao fato de que o mesmo apresenta íntima relação com seu veículo, bem como alto poder de penetração, o que lhe proporciona uma melhor atuação e rápida eliminação quando seu uso é empregado (HOLLAND *et al.*, 1991).

Devido às propriedades do Otosporin, buscamos estudar sua possível ação anti-inflamatória sobre a polpa de molares submetidos a clareação dentária, visando uma opção de tratamento para dentes com sensibilidade dentária após o procedimento clareador.

2. OBJETIVO

Investigar o potencial anti-inflamatório do Otosporin, quando aplicado topicamente, sobre o tecido pulpar de molares de ratos Wistar submetidos à clareação dentária.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Material

Animais

Foram utilizados 20 ratos machos (*Rattus albinus*, Wistar), pesando aproximadamente 200g, provenientes do biotério da Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” (UNESP) – Faculdade de Odontologia de Araçatuba. Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas, em ambiente com temperatura entre 22 e 24°C e ciclo de luz controlada (12 horas claro e 12 horas escuro). Cada gaiola abrigou quatro ratos, que foram alimentados durante todo o período experimental com dieta sólida e água “ad libitum”, com exceção das primeiras 8-12 horas antes das intervenções. Antes do início da fase experimental, o projeto foi submetido ao Comitê de Ética do local, tendo sido aprovado (CEUA nº 885-2012).

Drogas empregadas

Para anestesia dos animais foram utilizados, via intramuscular, um sedativo à base de xilazina (Dopaser, Calier S.A. - Barcelona, Espanha – 10mg/Kg) e um anestésico à base de Cloridrato de Ketamina a 5% (Vetanarcol, König S. A. – Avellaneda, Argentina – 25mg/Kg).

Como anti-inflamatório foi utilizado o Otosporin (Farmoquímica S. A. – Rio de Janeiro, RJ, Brasil).

Agentes Clareadores

Para clareação dentária foi empregado o agente clareador Whiteness HP Maxx (FGM Produtos Odontológicos) à base de H₂O₂ a 35%. Este produto apresenta-se comercialmente em dois frascos, um contendo o peróxido e o outro, o agente espessante, sendo estas substâncias misturadas na proporção de 3:1 (peróxido:espessante).

Métodos

Divisão em grupos

Os animais foram divididos em quatro grupos experimentais de acordo os tratamentos empregados (clareador e anti-inflamatório):

Tabela 1. Divisão dos grupos

	Otosporin	Veículo do Otosporin
Agente clareador	G1A	G2A
Veículo do agente clareador	G1B	G2B

Procedimentos clareadores

O tecido gengival ao redor dos dentes que foram clareados foi protegido com barreira gengival (FGM Produtos Odontológicos, Joinvile, SC, Brasil) e em seguida, o agente clareador Whiteness HP Maxx (FGM Produtos Odontológicos, Joinvile, SC, Brasil) foi preparado na proporção de 3:1 (peróxido de hidrogênio: espessante) e aproximadamente 0,01 mL do agente foram aplicados nos três molares superiores do lado direito de cada animal (n= 20). Para fins de controle, os molares do lado esquerdo foram tratados com o veículo do agente clareador (água destilada e espessante na proporção 3:1) (n= 20). Os dentes receberam o tratamento com agente clareador ou seu veículo por meio de uma aplicação direta de 30 minutos. Ao final da sessão clareadora, os dentes foram lavados com água destilada para a remoção das soluções.

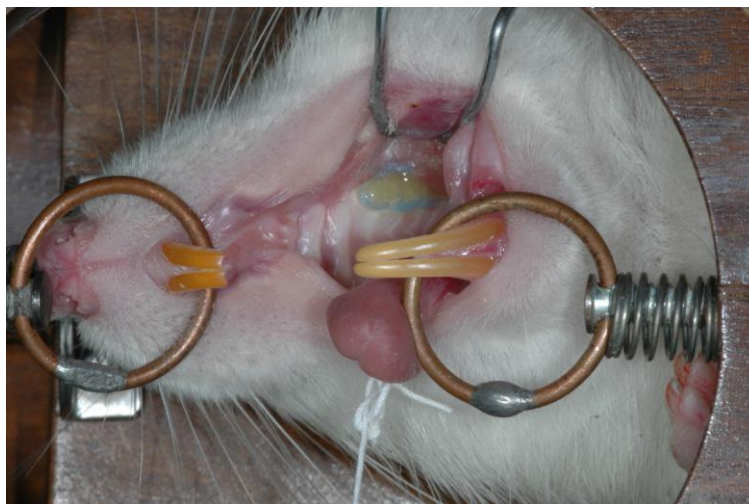


Figura 1 – Cobaia anestesiada e posicionada com aplicação da barreira gengival e agente clareador nos molares superiores.

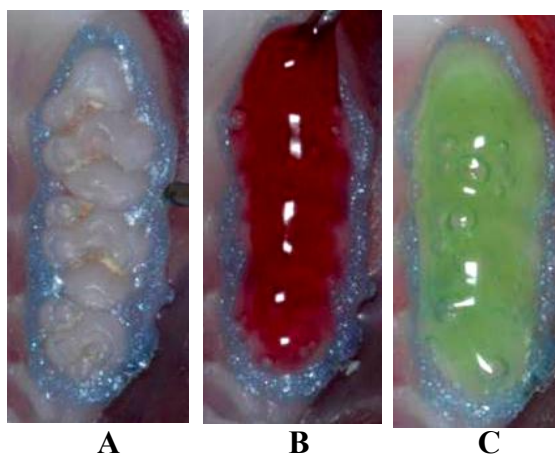


Figura 2 – Visão aproximada dos molares superiores com aplicação da barreira gengival (A) e gel clareador na sua fase inicial (B) e final (C).

Procedimentos pós-clareação

Após o procedimento clareador descrito acima, sobre os molares direito e esquerdo da metade dos animais, o Otosporin foi aplicado no volume aproximado de 0,01mL, durante 10 min (n = 20). Para fins de controle, a outra metade dos animais recebeu sobre seus molares o veículo do Otosporin, durante o mesmo tempo experimental. Os dentes foram lavados para a completa remoção do Otosporin, ou do seu veículo, e por fim, a barreira gengival foi retirada.

Eutanásia e processamento laboratorial

Dois dias após a intervenção (KINA *et al.*, 2010), os animais foram eutanasiados com uma sobredose de pentobarbital (100mg/kg) via intraperitoneal. A separação das hemimaxilas foi feita com a ajuda de tesoura e bisturi. As hemimaxilas foram colocadas em frascos contendo solução de formalina a 10% tamponada. Em seguida os espécimes foram lavados em água corrente por 5h e imersos em solução de EDTA a 18% para desmineralização. Posteriormente, as hemimaxilas foram lavadas em água corrente, desidratadas em álcool, diafanizadas em xilol e incluídas em parafina. Após inclusão, as peças foram cortadas longitudinalmente com cortes semi-seriados, com 6 µm de espessura, realizados em micrótomo (RM 2045, Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha). Para cada espécime, 10 lâminas com 3 cortes teciduais foram preparadas e coradas com Hematoxilina e Eosina. A análise microscópica foi realizada em microscópio óptico (DM 4000 B, Leica). Os resultados foram expostos por meio de duas análises, sendo uma descritiva e outra qualitativa, referentes a cada grupo experimental.

As lâminas contendo os cortes mais representativos de cada espécime foram avaliadas sob microscopia óptica e utilizadas na análise descritiva.

- ANÁLISE DESCRITIVA

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

- ANÁLISE QUALITATIVA

A análise qualitativa consistiu da avaliação do infiltrado inflamatório, atribuindo magnitudes registradas sob a forma de escores de 1 a 4, gerando dados para análise estatística por meio do Software Pacotico (Microsoft Visual FoxPro, Direitos: Eymar Sampaio Lopes).

O processo inflamatório foi analisado considerando sua intensidade e distribuição no tecido pulpar da polpa coronária, em conformidade com o número médio aproximado de

células inflamatórias presentes nos diferentes terços, de um mesmo espécime, examinados em aumento de 400X. Os escores atribuídos em cada terço foram:

- 1 – Células inflamatórias ausentes ou em número desprezível;
- 2 – Infiltrado inflamatório discreto (menos de 25 células por campo);
- 3 – Infiltrado inflamatório moderado (entre 25 e 125 células por campo);
- 4 – Infiltrado inflamatório severo (mais que 125 células por campo) ou necrose.

A avaliação microscópica foi efetuada por 3 observadores sem que soubessem quais grupos estariam avaliando e, depois de um consenso, determinaram os escores para cada espécime.

Com a finalidade de facilitar a atribuição dos escores e tornar esse ato menos subjetivo, a câmara pulpar foi subdividida em terços (Oclusal, Médio e Cervical). Desta forma, foi possível uma análise comparativa entre os grupos, considerando a intensidade e extensão do processo inflamatório.



Figura 3 – Divisão em terços da câmara pulpar.

Análise estatística

Os resultados obtidos foram submetidos à análise estatística, pelos testes de Kruskal Wallis e Dunn com nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

4. RESULTADOS

Grupo 1A – Agente clareador seguido do Otosporin

A maior parte dos espécimes deste grupo apresentou infiltrado inflamatório leve na região de terço oclusal da polpa coronária, e ausência de infiltrado inflamatório nos terços médio e cervical. Quatro espécimes apresentaram leve desorganização celular próximo à região de corno pulpar, com a presença de algumas células inflamatórias, dispersas e ao acaso, não caracterizando inflamação. O tecido pulpar apresentou-se íntegro, com camadas organizadas, principalmente a partir do terço médio ao terço cervical da polpa coronária sentido à polpa radicular (Quadro 1 e Figura 4).

Quadro 1 – Escores atribuídos ao grupo clareado seguido da aplicação do Otosporin, de acordo com os terços da polpa coronária.

G1A: Agente clareador seguido do Otosporin	n	Terços da Coroa											
		Oclusal				Médio				Cervical			
		1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
35% - 30'	1		X				X			X			
	2		X			X				X			
	3			X				X			X		
	4		X				X			X			
	5	X				X				X			
	6	X				X				X			
	7		X				X			X			
	8	X				X				X			
	9		X				X			X			
	10	X				X				X			

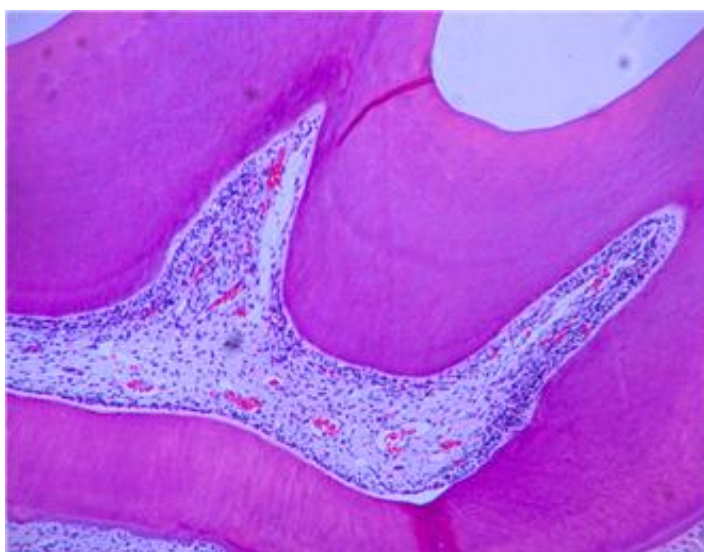


Figura 4 – Imagem representativa do grupo G1A. Região da polpa coronária evidenciando leve desorganização e infiltrado inflamatório moderado no terço oclusal [100x – H.E.].

Grupo 1B – Veículo do agente clareador seguido do Otosporin

Observou-se tecido pulpar com aspecto de normalidade e ausência de células inflamatórias em todos os espécimes, denotando homeostasia pulpar. A camada de odontoblastos apresentou-se organizada, e em continuidade com as estruturas pré-dentinária e dentina, que apresentaram-se íntegras. Os vasos sanguíneos apresentaram-se congestionados e a densidade do fibrosamento caracterizou polpa jovem com potencial de reparo (Quadro 2 e Figura 5).

Quadro 2 – Escores atribuídos ao grupo em que foi utilizado o veículo do agente clareador seguido da aplicação do Otosporin, de acordo com os terços da polpa coronária.

G1B: Veículo do agente clareador seguido do Otosporin	n	Terços da Coroa											
		Oclusal				Médio				Cervical			
		1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
35% - 30'	1	X				X				X			
	2	X				X				X			
	3	X				X				X			
	4	X				X				X			
	5	X				X				X			
	6	X				X				X			
	7	X				X				X			
	8	X				X				X			
	9	X				X				X			
	10	X				X				X			

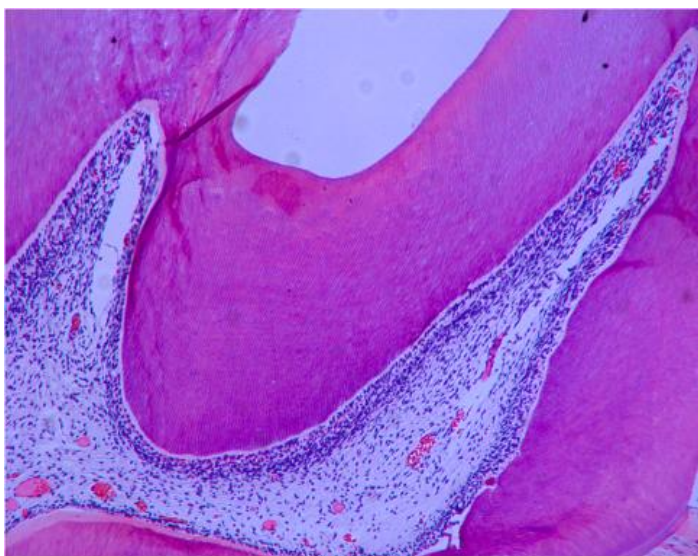


Figura 5 – Imagem representativa do grupo G1B. Região de polpa coronária evidenciando homeostasia pulpar e ausência de infiltrado inflamatório [100x – H.E.].

Grupo 2A – Agente clareador seguido do veículo do Otosporin

A maior parte dos espécimes deste grupo apresentou infiltrado inflamatório moderado a severo e áreas de necrose próximo a região de corno pulpar. No terço médio, a maior parte dos espécimes apresentou infiltrado inflamatório moderado. Ainda pode ser encontrado leve infiltrado inflamatório no terço cervical da polpa coronária na maior parte dos espécimes (Quadro 3 e Figura 6).

Quadro 3 – Escores atribuídos ao grupo clareado seguido da aplicação do veículo do Otosporin, de acordo com os terços da polpa coronária.

G2A: Agente clareador seguido do veículo do Otosporin	n	Terços da Coroa											
		Oclusal				Médio				Cervical			
		1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
35% - 30'	1				X			X		X			
	2				X			X			X		
	3				X				X		X		
	4			X			X				X		
	5			X				X			X		
	6			X			X			X			
	7			X			X			X			
	8			X			X			X			
	9				X			X			X		
	10				X			X				X	

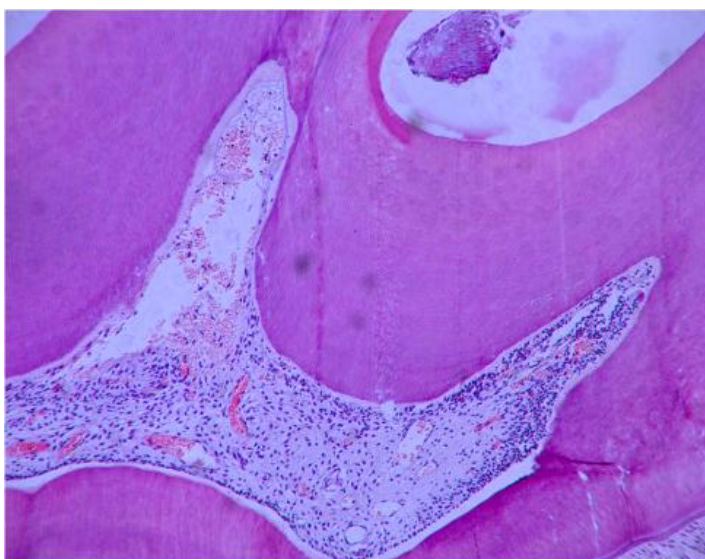


Figura 6 – Imagem representativa do grupo G2A. Região de polpa coronária evidenciando áreas de necrose no terço oclusal e infiltrado inflamatório moderado no terço médio [100x – H.E.].

Grupo 2B – Veículo do agente clareador seguido do veículo do Otosporin

Este grupo não apresentou presença de infiltrado inflamatório em nenhum de seus espécimes. A polpa coronária encontrara-se intacta, com camada de odontoblastos e demais camadas organizadas, vasos sanguíneos e densidade do fibrosamento com aspecto de normalidade e de polpa jovem (Quadro 4 e Figura 7).

Quadro 4 – Escores atribuídos ao grupo em que foi utilizado o veículo do agente clareador seguido da aplicação do veículo do Otosporin, de acordo com os terços da polpa coronária.

G2B: Veículo do agente clareador seguido do veículo do Otosporin	n	Terços da Coroa											
		Oclusal				Médio				Cervical			
		1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
35% - 30'	1	X				X				X			
	2	X				X				X			
	3	X				X				X			
	4	X				X				X			
	5	X				X				X			
	6	X				X				X			
	7	X				X				X			
	8	X				X				X			
	9	X				X				X			
	10	X				X				X			

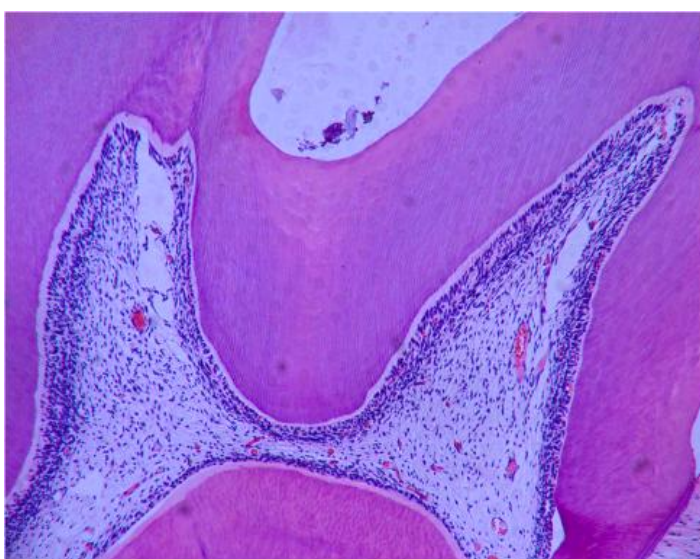


Figura 7 – Imagem representativa do grupo G2B. Região de polpa coronária evidenciando homeostasia pulpar e ausência de infiltrado inflamatório [100x – H.E.].

4.1 Análise estatística

Após a atribuição dos escores, os dados foram submetidos à análise estatística por meio do teste de Kruskal Wallis, seguido do teste de Dunn. Para todas as análises a significância adotada foi de 5% ($p < 0,05$). Os testes estatísticos foram realizados considerando cada terço coronário, objetivando tornar a avaliação menos subjetiva em função dos resultados observados.

COM RELAÇÃO AO TERÇO OCLUSAL:

A análise estatística do terço oclusal demonstrou diferença significativa entre alguns grupos ($p < 0,05$). A diferença foi observada na comparação entre o grupo G2A com os grupos G1A, G1B e G2B (Tabela 02).

Tabela 02 – Cruzamentos entre os grupos para o terço oclusal da coroa dentária.

	G1A	G1B	G2A	G2B
G1A				
G1B				
G2A	X	X		
G2B			X	

(x) Significante para $p < 0,05$

COM RELAÇÃO AO TERÇO MÉDIO:

A análise estatística do terço médio demonstrou diferença significativa ($p < 0,05$) entre o grupo G1B com o grupo G2A e entre os grupos G2A e G2B (Tabela 03).

Tabela 03 – Cruzamentos entre os grupos para o terço médio da coroa dentária.

	G1A	G1B	G2A	G2B
G1A				
G1B			X	
G2A				X
G2B				

(x) Significante para $p < 0,05$

COM RELAÇÃO AO TERÇO CERVICAL:

A análise estatística não demonstrou diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos no terço cervical da polpa coronária.

Este aspecto denota que o terço oclusal do grupo que foi clareado e não recebeu a aplicação do Otosporin apresenta alterações estatisticamente significativas com os demais grupos, inclusive com o grupo que foi clareado e recebeu a aplicação do Otosporin. Já no terço médio, as alterações estatisticamente significativas são encontradas entre o grupo clareado sem a aplicação do Otosporin com os grupos que serviram de controle. Ao se comparar o grupo clareado seguido da aplicação do Otosporin com os grupos controle, não foram encontradas diferenças significativas.

5.DISSCUSSÃO

Da metodologia

Já é sabido que o H₂O₂ contido no gel clareador, causa alterações morfológicas e histoquímicas nas estruturas dentárias, como no trabalho de Hegedus *et al.* (1999), que mostra que após a clareação dentária, houve um aumento em número e em extensão dos sulcos presentes no esmalte dentário, e o trabalho de Rotstein *et al.* (1996), que evidencia perda de cálcio tanto em esmalte quanto em dentina, após o procedimento clareador. Outros estudos mostram que o H₂O₂ tem capacidade de penetrar através do esmalte e dentina (BENETTI *et al.*, 2004; CINTRA *et al.*, 2014a), e causar danos ao tecido pulpar (CINTRA *et al.*, 2013; CINTRA *et al.*, 2014; COSTA *et al.*, 2010).

Alguns estudos “in vivo” têm avaliado microscopicamente a resposta pulpar ocorrida em decorrência da clareação dentária (CINTRA *et al.*, 2013; CINTRA *et al.*, 2014; COSTA *et al.*, 2010;FRIGO *et al.*, 2009; KINA *et al.*, 2010;SEALE *et al.*, 1981). Dentre estes, encontra-se os estudos de Cintra *et al.*(2013; 2014), que avaliaram a influência do número de sessões de clareação sobre a polpa dentária de ratos Wistar, bem como a influência da concentração e do tempo de aplicação do gel clareador sobre as estruturas dentárias.

Devido à impossibilidade de se reproduzir em laboratório as condições fisiológicas do complexo dentino pulpar, resultados de estudos “in vitro” podem apresentar diferenças dos resultados de estudos “in vivo” (KINA *et al.*,2010), já que dentes com polpas dentárias vitais apresentam componentes que podem impedir ou dificultar a penetração dos agentes clareadores através dos túbulos dentinários, como as extensões citoplasmáticas dos odontoblastos e o fluido dentinário, que movimentam-se por meio da pressão intrapulpar (HANKS *et al.*, 1993).

Além disso, a polpa dentária quando vital, apresenta sistemas de defesa que protegem suas células dos efeitos citotóxicos causados pelo agente clareador, na tentativa de evitar a ocorrência de maiores danos, como agentes antioxidantes endógenos, que consiste em enzimas como a catalase e superóxido dismutase, que promovem a degradação do H₂O₂, protegendo as células pulpares dos efeitos citotóxicos do agente clareador (ESPOSITO *et al.*,2003)

Sendo assim, os experimentos “in vivo” representam de forma mais fidedigna a técnica da clareação dentária (FRIGO *et al.*,2009).

Como modelo experimental neste estudo, foram selecionados ratos Wistar, machos e adultos jovens, por estarem sujeitos a menores variações hormonais que as fêmeas, devido a possíveis alterações no processo de reparo tecidual, conforme o período de ciclo ovulatório em que poderiam se encontrar. (FONTES, 2001). A utilização de ratos para um trabalho de pesquisa apresenta várias vantagens, como a facilidade de manipulação e de reprodução, o tempo de vida, tamanho, peso, custo, armazenagem, alimentação, controle e previsibilidade (PENNA; RODE, 2000).

Podemos encontrar alguns estudos “in vivo” utilizando ratos, para verificar a influência de agentes clareadores na polpa, que optaram pelo emprego dos dentes incisivos destes animais (FRIGO *et al.*, 2009). Em nosso estudo, optamos pela aplicação do agente clareador nos molares destes animais, devido à morfologia semelhante aos dentes humanos, com relação à proporção de esmalte e dentina. Nos incisivos de ratos, a proporção de esmalte é bem maior quando comparada a de dentes humanos (cerca de 30% em incisivos centrais humanos e 64% em incisivos de ratos), e a proporção de dentina, menor (cerca de 70% em incisivos centrais humanos e 36% em incisivos de ratos) (LIMA, 2003; SULIEMAN *et al.*, 2005).

Os dentes molares de ratos Wistar apresentam diferenças dimensionais com relação aos dentes humanos, porém a utilização de grupos controle nos permite identificar e analisar a degradação e destruição do tecido pulpar nos grupos experimentais em proporções relativas às originais.

Cintra *et al.* (2013), ao avaliarem a influência da concentração do gel clareador sobre a polpa, puderam comprovar a semelhança de seus resultados com os achados do estudo de Costa *et al.* (2010), que avaliaram a influência do gel clareador sobre a polpa de forma semelhante, porém em dentes incisivos humanos. Considerando tais semelhanças, os autores sugerem que estudos realizados em molares de ratos Wistar podem ser direcionados e aprimorados para prever resultados de procedimentos realizados em dentes humanos.

A eutanásia dos ratos foi realizada 48 horas após o procedimento clareador, assim podemos avaliar o estado do tecido pulpar em sua maior inflamação.

Ao avaliarem a influência da concentração do gel clareador sobre a polpa, Cintra *et al.* (2013) verificaram que com apenas uma sessão de clareação dentária, o terço oclusal da polpa coronária apresentou infiltrado inflamatório severo à necrose. Cintra *et al.* (2014), com o mesmo modelo experimental, pode comprovar que tanto a concentração quanto o tempo de aplicação do gel clareador sobre as estruturas dentárias, influenciam a ocorrência

de danos causados ao tecido pulpar, aumentando esses danos a medida que se aumentava a concentração e o tempo de aplicação.

Assim, buscamos encontrar soluções, por meio de medicamentos anti-inflamatórios, para minimizar os danos que o agente clareador causa sobre a polpa dentária.

Na literatura não existe nenhum estudo pertinente relacionando o uso do Otosporin como dessensibilizante do tecido dentário. Em contrapartida, ele é amplamente utilizado pelos otorrinolaringologistas europeus e também dos Estados Unidos, para tratamento ototópico, por estar relacionado com satisfatória penetração no ouvido médio e por apresentar um amplo espectro de atividade antibacteriana (GARCIA-RODRIGUEZ *et al.*, 1993; GEHANNO, 1997; LEGENT *et al.*, 1994; LUNDY; GRAHAM, 1993).

Dos resultados

O H₂O₂, devido a seu baixo peso molecular e sua capacidade em promover a desnaturação protéica, penetra por meio do esmalte e dentina, atingindo a polpa (BARATIERI, 1996; HAYWOOD *et al.*, 1991; McEVOY, 1989).

Pesquisas atuais a respeito da clareação dentária tem se preocupado em investigar e solucionar os efeitos indesejáveis decorrentes deste procedimento (CHARAKORN *et al.*, 2009; MINOUX; SERFATY, 2008) como a presença da posterior sensibilidade espontânea.

Analisando os estudos de Holland *et al.* (1980; 1981; 1991), que avaliaram a ação do Otosporin em contato direto com o tecido pulpar, optamos por avaliar o efeito deste quando aplicado topicamente no esmalte dental clareado.

Observando-se nossos resultados e tendo em vista que alguns autores tem sugerido que a sensibilidade dentária seja proveniente ou esteja intimamente relacionada com a inflamação causada pelos agentes clareadores na polpa (KIM, 1990; REIS *et al.*, 2011), podemos constatar no grupo G2A, que recebeu o agente clareador seguido do veículo do Otosporin (Quadro 3; figura 6), intensa desorganização celular e áreas de necrose, ao passo que o grupo G1A, tratado com o Otosporin imediatamente após o tratamento clareador (Quadro 1; figura 4), apresentou-se com organização celular e resposta inflamatória leve. Assim, observamos que o Otosporin mostrou-se efetivo na redução do processo inflamatório causado pelo agente clareador.

A sensibilidade dentária gerada após a clareação pode estar relacionada com o fato de que os agentes clareadores liberam oxigênio na polpa dentária, e com isso ocorre liberações

de mediadores químicos (ATP e prostaglandinas), o que possivelmente poderá sensibilizar os nociceptores pulpares (COOK; MCCLESKEY,2002; GOODIS *et al.*,2000).

Além disso, o procedimento de clareação dentária pode, possivelmente, aumentar a expressão de substância P, um neuropeptídeo que é um neurotransmissor nociceptivo responsável, entre outras, pela modulação e sensação de dor (CAVIEDES-BUCHELI *et al.*, 2008). Isso, de certa forma, poderia justificar a intenção da utilização de anti-inflamatórios após o procedimento clareador.

Certamente uma das questões a ser discutida é de como essa medicação tópica (Otosporin) poderia atingir o complexo dentino-pulpar. A resposta é baseada no fato de que essa medicação consiga alcançar as células presentes no tecido pulpar através da difusão pelos microporos ou microtrincas presentes no esmalte dental, já evidenciados por outros estudos(BENETTI *et al.*, 2004; KAWAMOTO; TSUJIMOTO, 2004). Além disso, não podemos esquecer que os agentes clareadores, quando aplicados sobre o esmalte, são capazes de aumentar a porosidade do mesmo devido ao rompimento das proteínas da matriz dessa estrutura (KAWAMOTO; TSUJIMOTO, 2004).

Nos grupos controles (G1B e G2B), que receberam o veículo do agente clareador, seguido da aplicação do Otosporin ou seu veículo, pode-se observar tecido pulpar íntegro, com pré-dentina e dentina sem alterações e em continuidade com a camada de odontoblastos.

6. CONCLUSÃO

Considerando as limitações do modelo experimental, pode-se concluir que o Otosporin, quando aplicado topicamente durante 10 minutos, sobre a superfície dentária após o procedimento clareador com peróxido de hidrogênio a 35%,foi capaz de minimizar os efeitos do agente clareador no tecido pulpar.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Barghi N. Making a clinical decision for vital tooth bleaching: at-home or in-office? **CompendContinEduc Dent**. 1998; 19:831-8; quiz 840.
2. Baratieri, L. N. Clareamento de dentes vitais, cap 6, p. 31-88, 1996. In: **Clareamento Dental**. Edit. Santos/Quintessence Books, 1996.
3. Benetti AR, Valera MC, Mancini MNG, Miranda CB & Balducci I. In vitro penetration of bleaching agents into the pulp chamber. **IntEndod J**. 2004;37(2) 120
4. Buchalla, W; Attin, T. External bleaching therapy with activation by heat, light or laser – a systematic review. **Dent Mater**. 2007;23(5):586-96.
5. Camps J, de Franceschi H, Idir F, Roland C, About I: Time-course diffusion of hydrogen peroxide through human dentin: clinical significance for young tooth internal bleaching. **J Endod**. 2007;33: 455–459.
6. Camps J, Pommel L, Aubut V, About I. Influence of acid etching on hydrogen peroxide diffusion through human dentin. **Am J Dent**. 2010 Jun;23(3):168-70.
7. Cannon M, Cernigliaro J, Vieira A, Percinoto C, Jurado R. Effects of antibacterial agents on dental pulps of monkeys mechanically exposed and contaminated. **J ClinPediatr Dent**. 2008 Fall;33(1):21-8.
8. Carrasco-Guerisoli LD, Schiavoni RJ, Barroso JM, Guerisoli DM, Pécora JD, Fröner IC. Effect of different bleaching systems on the ultrastructure of bovine dentin. **Dent Traumatol**. 2009 Apr;25(2):176-80.
9. Caviedes-Bucheli J, Ariza-García G, Restrepo-Méndez S, Ríos-Osorio N, Lombana N, Muñoz HR. The effect of tooth bleaching on substance P expression in human dental pulp. **J Endod**. 2008; 34:1462-5
10. Charakorn P, Cabanilla LL, Wagner WC, Foong WC, Shaheen J, Pregitzer R, Schneider D. The effect of preoperative ibuprofen on tooth sensitivity caused by in-office bleaching. **Oper Dent**. 2009; 34(2):131-5.
11. Cintra LTA, Benetti F, Ferreira LL, Ervolino E, Briso ALF. Dental bleaching concentration influences the penetration capacity and damage in pulp of rat teeth. In press. 2014a.

12. Cintra LTA, Benetti F, Ferreira LL, Ervolino E, Briso ALF. Dental bleaching concentration and the time influences pulp tissue damage and repair in rat teeth. In press. 2014.
13. Cintra LTA, Benetti F, da Silva Facundo AC, Ferreira LL, Gomes-Filho JE, Ervolino E, Rahal V, Briso AL. The number of bleaching sessions influences pulp tissue damage in rat teeth. *J Endod* 2013 Dec;39(12):1576-80.
14. Costa CAS, Riehl H, Kina JF, Sacono NT, Hebling J. Human pulp responses to the in-office tooth bleaching treatment. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.** 2010;109:e59-64.
15. Cook, S.P.; McCleskey, E.W. Cell damage excites nociceptors through release of cytosolic ATP. *Pain*. 2002;95:41-7.
16. de Souza V, Nery MJ, Holland R, Tagliavini RL, de Mello W, Bernabe PF. Reaction of the periapical tissues of dogs teeth to chlorhexidine or antibiotics combined with corticosteroids. **Rev Assoc Paul Cir Dent Reg Aracatuba.** 1981;2(2):5-9.
17. Esposito, P.; Varvara, G.; Murmura, G.; Terlizzi, A.; Caputi, S. Ability of healthy and inflamed human dental pulp to reduce hydrogen peroxide. **European Journal of Oral Sciences.** 2003;111:454-6.
18. Fontes CER. Estudo do reparo do ferimento de colon de rato com o lado seroso da parede de jejuno, utilizando cianocrilato e cola de fibrina. 2001. 49f. Tese (doutorado em medicina) – Escola Paulista Medicina, 2001.
19. Frigo, L.; Pallota, R. C.; Meneguzzo, D.; Marcos, R. L.; Penna, S. C.; Lopes-Martins, R. A. B. Avaliação do efeito da clareação dentária fotoativada sobre a polpa dentária em modelo experimental de ratos. **Rev Dental Press Estét.** 2009 jan-mar; 6(1):102-114.
20. García-Rodríguez JA, Del Cañizo A, García Sánchez JE, *et al.* Efficacy of 2 regimens of local ciprofloxacin in the treatment of ear infections. **Drugs** 1993;45(Suppl 3):327-8.
21. Gehanno P, the French Study Group. Multicenter study of the efficacy and safety of oral ciprofloxacin in the treatment of chronic suppurative otitis media in adults. **Otolaryngol Head Neck Surg.** 1997;117:83-90.
22. Goldstein, R.E. et al. Esthetic update: the changing esthetic dental practice. **J Am Dent Assoc.** 1994;125:1447-56.
23. Goodis HE, Bowles WR, Hargreaves KM. Prostaglandin E2 enhances bradykinin-evoked iCGRP release in bovine dental pulp. **Journal of Dental Research** 2000;79:1604-7.

24. Hanks, C. T.; Fat, J. C.; Wataha, J. C.; Corcoran, J. F. Cytotoxicity and dentin permeability of carbamide peroxide and hydrogen-peroxide vital bleaching materials, in vitro. **Journal of Dental Research**. 1993;72:931–8.
25. Hannig C, Weinhold HC, Becker K, Attin T. Diffusion of peroxides through dentine in vitro with and without prior use of a desensitizing varnish. **Clin Oral Investig**. 2011 Dec;15(6):863-8.
26. Haywood VB, Heymann HO. Nightguard vital bleaching: how safe is it? **Quintessence Int**. 1991 July;22(7):515-23.
27. Haywood HB, Leonard RH, Nelson CF *et al*. Effectiveness, side effects and long-term status of nightguard vital bleaching. **J Am Dent Assoc**. 1994;125(9):1219-26.
28. Haywood, V.B. Treating sensitivity during tooth whitening. **Compend Contin Educ Dent**. 2005;26(9):11-20.
29. Hegedüs C, Bistey T, Flora-Nagy E, Keszthelyi G, Jenei A. An atomic force microscopy study on the effect of bleaching agents on enamel surface. **J Dent**. 1999;27:509-15.
30. Hirata, R. et al. Clareamento de dentes vitalizados: situação clínica atual. **JBC**. 1997; 1(1):13-21.
31. Holland R, de Souza V, Nery MJ, Bernabé PF, de Mello W, Otoboni Filho JA. The use of corticosteroid-antibiotic combinations during endodontic therapy. **Rev Paul Endod**. 1980 Apr-Jun;1(2):4-7.
32. Holland R, Nery MJ, Souza V, Mello W, Bernabé PFE, Otoboni-Filho, JA . The effect of corticosteroid-antibiotic dressing in the behaviour of the periapical tissue of dog's teeth after overinstrumentation. **Revista de Odontologia da UNESP**. 1981; 10:21-5.
33. Holland R, Okabe JN, de Souza V; Saliba O . Diffusion of corticosteroid-antibiotic solutions through human dentine. **Revista de Odontologia da UNESP**. 1991; 20:17-23.
34. Holland R, Otoboni Filho JA, de Souza V, Nery MJ, Bernabé PF, Dezan Júnior E. Calcium hydroxide and a corticosteroid-antibiotic association as dressings in cases of biopulpectomy. A comparative study in dogs' teeth. **Braz Dent J**. 1998;9(2):67-76.
35. Kawamoto K, Tsujimoto Y. Effects of the hydroxyl radical and hydrogen peroxide on tooth bleaching. **J Endod**. 2004;30:45-50.
36. Kina JF, Huck C, Riehl H, Martinez TC, Sacono NT, Ribeiro AP, Costa CA. Response of human pulps after professionally applied vital tooth bleaching. **Int Endod J**. 2010 Jul;43(7):572-80.

37. Kim S. Neurovascular interactions in the dental pulp in health and inflammation. **J Endod.** 1990;16:48-53.
38. Korytowski W, Sarna T. Bleaching of melain pigments. Role of copper ions and hydrogen peroxide in autooxidation and photoxidation of synthetic dopa-melanin. **J BiolChem.** 1990;265:12410-6.
39. Legent F, Bordure Ph, Beauvillain B, *et al.* Controlled prospectivestudy of oral ciprofloxacin versus amoxycillin/clavulanicacid in chronic suppurative otitis media in adults. **Chemotherapy.**1994;40(Suppl 1):16-23.
40. Lima, H. C. S. M. Efeitos da dieta hipoproteica na formação e composição de estruturas dentarias. Estudo experimental em ratos wistar. 2003. 65f. Tese (mestrado em biquimica) – Universidade federal do Rio Grande do Norte, 2003
41. Lundy LB, Graham MD. Ototoxicity and ototopical medications:a survey of otolaryngologists. **Am J Otol.** 1993;14:141-6.
42. Markowitz. Pretty painful: Why does tooth bleaching hurt? *Medical Hypotheses.* 2010;74:835-40.
43. McEvoy, S. A. Chemical agents for removing intrinsic stains fromvital teeth. I. Technique development. **Quintessence Int.** 1989;20(5):323-8.
44. Minoux M, Serfaty R. Vital tooth bleaching: biologic adverse effects-a review. **Quintessence Int.** 2008;39:645-59.
45. Panzarini SR, Trevisan CL, Brandini DA, Poi WR, Sonoda CK, Luvizuto ER, Dos Santos CL. Intracanal dressing and root canal filling materials in tooth replantation: a literature review. **DentTraumatol.** 2012 Feb;28(1):42-8.
46. Penna LAP, Rode SM. Estudo morfológico da polpa de molares de ratos Wistar frente a uma oclusão traumática experimental. **PesqOdont Bras.** 2000 abr/jun;14(2):159-164.
47. Percinoto C, de Castro AM, Pinto LM. Clinical and radiographic evaluation of pulpotomies employing calcium hydroxide and trioxide mineral aggregate. **Gen Dent.** 2006 Jul-Aug;54(4):258-61.
48. Portolani Junior, M.V. *et al.* Efeito dos agentes clareadores sobre as estruturas dentais. **Rev Odontol UNESP.** 2005; 34(2):91-4.
49. Reis A, Dalanhol AP, Cunha TS, Kossatz S, Loguercio AD. Assessment of tooth sensitivity using a desensitizer before light-activated bleaching. **Oper Dent.**2011;36:12-7.
50. Rotstein I, Dankner E, Goldman A, Heling I, Stabholz A, Zalkind M. Histochemical analysis of dental hard tissues following bleaching. **J Endod.**1996;22:23-5.

51. Seale NS, McIntosh JE, Taylor AN. Pulpal reaction to bleaching of teeth in dogs. **J Dent Res.** 1981;80:948-53.
52. Smith RB, Moodie J. Comparative efficacy and tolerability of two antibacterial/anti-inflammatory formulations ('Otomize' spray and 'Otosporin' drops) in the treatment of otitis externa in general practice. **Curr Med Res Opin.** 1990;11(10):661-7.
53. Sulieman, M.; Addy, M.; Rees, J. S. Surface and intra-pulpal temperature rises during tooth bleaching: an in vitro study. **Br Dent J.** 2005;199(1):37-40.
54. ten Bosch JJ, Coops JC. Tooth color and reflectance as related to light scattering and enamel hardness. **J Dent Res.** 1995; 74: 374-80.

ANEXO**Certificado da Aprovação da Comissão de Ética na Experimentação Animal**

Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA)
Committee for Ethical Use of Animals (CEUA)

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto "Estudo in vivo do potencial anti-inflamatório do Ostosporin empregado em dentes de rato após clareação dentária" sob responsabilidade do Pesquisador **LUCIANO TAVARES ANGELO CINTRA** e colaboração de Larissa Álamo, Carla Renata Sipert e André Luiz Fraga Briso está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pelo CEUA, de acordo com o processo **00885-2012**.

CERTIFICATE

We certify that the research "In vivo study of the anti-inflammatory potential of Ostosporin on rat teeth following dental bleaching", process number **00885-2012**, under responsibility of **LUCIANO TAVARES ANGELO CINTRA** and with collaboration of Larissa Álamo, Carla Renata Sipert and André Luiz Fraga Briso agree with Ethical Principles in Animal Research (COBEA) and was approved by CEUA.


Prof. Dr. Fabiano A. Cadioli

CEUA Coordinator