



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

Sibele Alcântara Müller Troncoso

**Efeito do volume de gel clareador na alteração
cromática, penetração trans-amelodentinária de
 H_2O_2 e no estresse oxidativo no tecido pulpar**

Araçatuba - SP
2021

Sibele Alcântara Müller Troncoso

Efeito do volume de gel clareador na alteração cromática, penetração trans-amelodentinária de H_2O_2 e no estresse oxidativo no tecido pulpar

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, para obtenção do Grau de “Mestra em Odontologia” Área de Concentração Dentística.

Orientador: Prof. Assoc. André Luiz Fraga Briso

Araçatuba - SP
2021

Catálogo na Publicação (CIP)

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

T853e	Troncoso, Sibeles Alcântara Müller Efeito do volume de gel clareador na alteração cromática, penetração trans-amelodentinária de H₂O₂ e no estresse oxidativo no tecido pulpar / Sibeles Alcântara Müller Troncoso. - Araçatuba, 2021 46f. ; tab. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia de Araçatuba Orientador: Prof. André Luiz Fraga Briso 1. Clareamento dental 2. Estresse oxidativo 3. Óxido nítrico 4. Posologia 5. Peróxido de hidrogênio I. T. Black D2 CDD 617.6
-------	--

Claudio Hideo Matsumoto – CRB-8/5550

*Ao meu querido avô, José de Siqueira (in memoriam), meu esposo
Igor, meus pais (de sangue e de coração), meus irmãos, meus
sobrinhos e à minha fiel companheira, Livia Maria.*

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao meu querido avô, José de Siqueira (in memorian)

Nascido em 02 de fevereiro de 1931, meu avô foi um pai deveras rígido e extremamente exigente. Segundo minha mãe, sua infância e adolescência foi de regimento militar. Felizmente, como avô, me lembro de um homem sério, mas carinhoso. Sr. José, de Siqueira, “Zezinho” para os íntimos, “Vô Zezinho” para mim, dedico este título em sua memória, pois suas palavras tornaram-se molas propulsoras a impulsionar meu caminho nos estudos e a buscar a cada dia ser uma pessoa melhor. Cresci com sua voz ecoando dentro de mim: “A doutora chegou...essa vai ser doutora”. Pois é, meu estimado vôzinho, estou caminhando. Em breve serei mestra e o doutorado está logo ali, há uns obstáculos de distância. Meu avô se foi deste mundo em 16 de março de 2009 vítima de CA metastático e na última vez que nos vimos, em janeiro desse fatídico ano, ele desceu do carro em frente à minha casa, já fragilizado pela doença, me pediu apoio dos braços e disse: “Agora eu consigo chegar a qualquer lugar com você me apoiando”. Eu não tive tempo de responde-lo à altura e acredito que este é um momento oportuno: “Eu também consigo chegar a qualquer lugar, meu avô, porque eu sei que os seus braços jamais se distanciaram dos meus”!

Jamais o esquecerei!

Ao meu melhor amigo, meu esposo, meu amor, Igor

Desde que nos conhecemos, ele sempre me apoiou em todos os meus projetos. Foi meu alicerce nos anos finais da graduação e nos meus dias mais difíceis, dividiu comigo minhas tristezas e chorou comigo minhas lágrimas. E a sensação que tenho é de que ele sempre esteve em minha vida, mesmo quando nem nos conhecíamos. Sorrimos juntos em todas as nossas conquistas e celebramos veemente cada vitória. Ele me apoiou neste sonho e me ajudou a torná-lo realidade. Igor, meu advogado preferido, meu amor, eu te dedico este título, este trabalho, esta conquista e, acima de tudo, eu te dedico a minha vida.

Amo você ad infinitum!

Aos meus pais, Benedito e Madalena

Meus queridos pais, provedores e educadores. Agradeço infinitamente a boa educação que me deram e os exemplos de honestidade, caráter e princípios. Meu pai me incentivou a leitura desde pequenina, quando lia para mim as “Aventuras de Hércules”...jamais me esquecerei como me transportava para aquelas grandes batalhas com animais gigantes, leões ferozes e as maravilhas da mitologia grega. Cresci em meio a livros e histórias fantásticas. Minha mãe, professora, nunca me cobrou esse ofício, embora acredite que este tenha vindo “cravado” em minha alma. Pai e Mãe, mesmo distante há alguns anos, sei que estamos próximos no coração e através de orações.

Amo vocês!

Aos meus irmãos, Sidney e Sidnéia

Nossos irmãos são a nossa melhor ponte com o passado. Possuímos as mesmas raízes sólidas de um tronco firme. Eu tive a sorte de ser a última filha dessa família. A caçula de dois irmãos que sempre me amaram. Dedico também a vocês esta conquista que não é só minha, mas de toda a família!

Amo vocês!

Aos meus sobrinhos, Lucas e Guilherme

Sobrinhos são filhos do coração! Um sobrinho é o melhor presente que podemos ganhar de um irmão e eu ganhei dois lindos meninos. Lucas, meu “primogênito”, nasceu quando eu tinha 13 anos apenas e foi o máximo! Entrei “ilegalmente” na maternidade só para ter ver. Tão pequenino, com uma roupinha azul...os olhinhos tão puxadinhos...eu quis tocá-lo, de forma delicada, encostei meu dedo naquela mãozinha tão minúscula e você se agarrou a mim tão forte que ali eu soube que havia ganhando um companheirinho para a vida. Não contive uma lágrima que escorreu pelo meu rosto nem a alegria que acendeu em meu coração. Vivemos alguns anos separados geograficamente e quando você completou 8 anos, quebramos esta barreira e me mudei para sua casa. Roubei o seu quarto; seu espaço e desta vez, eu me agarrei a você. Andávamos de bicicleta quase todos os dias... caminhávamos no bosque... vivíamos juntos. Os anos se passaram. De repente, eu acordei um dia e você já havia crescido e eu não havia dado conta. Não éramos mais inseparáveis. Lú, hoje você já é um homem, mas saiba que jamais deixará de ser aquele pequeno bebê cujo nascimento derreteu

meu coração. Eu o amo muito e te dedico este título para que lhe sirva de inspiração de que nada na vida é fácil, mas que com perseverança, fé e coragem, conseguimos tudo o que sonhamos!

Guilherme, nasceu sete anos após seu irmão. Eu não pude vê-lo na maternidade, como foi com seu irmão. Mas chorei e me alegrei à distância quando soube da sua chegada. Um ano após seu nascimento, me mudei para sua casa e aí começou uma linda história de amor. Meu grudinho, aonde quer eu fosse, lá estava ele...atrás da “Tia Bele”. Dormíamos juntinhos todos os dias. Eu despertei seu gosto pelo Inglês, te ensinei as primeiras palavrinhas estrangeiras e você me ensinou a amar incondicionalmente. Me ensinou a ser menos egoísta, a me importar menos com coisas materiais e a dar mais valor àquilo que realmente importa. Tão pequeno e tão grande...meu melhor amigo, tantas vezes. A vida nos separou em alguns momentos, mas sempre estamos juntos, no fim. A “Tia Bele” te ama muito e te dedico esta conquista para que lhe inspire a lutar pelos seus sonhos sempre!

Amo vocês, meus filhos do coração!

Aos meus pais de coração, Carlos e Eneida

Agradeço todo o apoio e acolhimento que sempre me deram desde que me conheceram, tornando-me parte da família. É uma grande alegria podermos dividir este momento.

Amo vocês!

A minha fiel companheira, e irmã de coração, Livia Maria

Livia Maria, meu apoio incondicional desde que iniciei o mestrado. Já lhe disse um milhão de vezes e continuo a repetir, se não fosse por você este dia não seria possível. Muito obrigada por estar comigo sempre e por ter me ensinado tanto. Espero que a vida continue nos mantendo próximas e com os mesmos propósitos. Este título também é seu, mestra²!!!

Minha gratidão será eterna!

AGRADECIMENTOS

Agradeço à **Deus**, pois quando O temos e O trazemos em nosso coração, Ele providencia todo o necessário, mas sem a graça divina nosso trabalho é em vão.

Ao meu Orientador **Prof. André Luiz Fraga Briso**, por ter me auxiliado e me acolhido antes mesmo de meu ingresso na pós-graduação, quando eu ainda estava terminando a faculdade de Odontologia em outra Instituição. Minha gratidão é imensa, assim como minha admiração pelo seu trabalho e carreira. Agradeço pela oportunidade de ter aprendido tanto e evoluído tanto durante esses dois anos de mestrado e espero ter superado ao menos um pouquinho de suas expectativas.

Ao **Prof. Paulo Henrique dos Santos**, agradeço imensamente por contribuir de uma forma tão cuidadosa para com todos que passam pelo Departamento de Dentística, assim como foi para o meu aprendizado na Pós-Graduação.

Ao **Prof. Luciano Tavares Angelo Cintra**, agradeço pelo apoio no desenvolvimento e interpretação da parte *in vivo* deste trabalho, bem como na disponibilização de seu tempo para ensinar, explicar e esclarecer dúvidas durante este processo.

À **Profa. Francine Benetti**, que egressou da Instituição pouco tempo depois de meu ingresso, mas que ainda sim, neste pouquíssimo tempo de convívio, se mostrou tão solícita e disponível.

À **Profa. Marjorie de Oliveira Gallinari** com quem tive o privilégio de conviver algum tempo e usufruir de seu extremo conhecimento, gentileza e amizade. Obrigada Marjozita, você nos inspira.

Ao **Prof. Edilson Ervolino** pela sua disponibilidade em me guiar na execução da análise imunoistoquímica, essencial para este trabalho. Muito obrigada.

“Não há acaso, sina, destino, que possa limitar, impedir ou controlar a firme resolução de uma alma determinada”.

Ella Wheller Wilcox

Troncoso SAM. Efeito do volume de gel clareador na alteração cromática, penetração trans-amelodentinária de H₂O₂ e no estresse oxidativo no tecido pulpar [dissertação]. Araçatuba: Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista; 2021.

RESUMO

Objetivo: Avaliar a influência do volume de gel clareador na alteração cromática (ΔE e ΔWid), difusão do peróxido de hidrogênio (PH), resposta inflamatória e estresse oxidativo pulpar. **Materiais e métodos:** *In vitro* - 60 dentes bovinos divididos em 4 grupos, de acordo com o volume de gel (n = 15): SG - sem gel; V30 - 30 μL de PH 35%; V60 - 60 μL ; V120 - 120 μL . A análise da difusão de PH foi realizada na 1ª sessão (T1) e as análises de alteração cromática foram realizadas após T1, 2ª (T2), 3ª (T3) sessões e 15 dias (T4) após o tratamento. Os dados foram submetidos à ANOVA e Teste de *Tukey* ($\alpha < 0,05$). *In vivo* - 20 ratos foram distribuídos em 4 grupos (n = 10), de acordo com o volume de gel: Controle – sem tratamento; V2 - 2 μL de PH 17,5%; V4 - 4 μL e V8 - 8 μL . Após 24 horas, os animais foram eutanasiados e as maxilas processadas para avaliação histológica e imunoistoquímica (óxido nítrico). Os dados foram submetidos aos testes de Wilcoxon e Mann-Whitney ($\alpha < 0,05$). **Resultados:** Observou-se que ΔE e Wid não foram influenciados pelo volume. A difusão de PH, a resposta inflamatória e o estresse oxidativo foram proporcionais ao volume. **Conclusão:** A eficácia clareadora não é proporcional ao volume enquanto os danos oxidativos são. **Relevância clínica:** Um menor volume de gel é mais seguro para o tratamento além de ter a mesma eficácia clareadora de volumes maiores.

Palavras-chave: Clareamento dental. Estresse oxidativo. Óxido nítrico. Posologia. Peróxido de hidrogênio.

Troncoso SAM. Effect of bleaching gel volume on chromatic alteration, transenamel and transdentinal penetration of H₂O₂ and oxidative stress on pulp tissue [dissertation]. Araçatuba: UNESP - São Paulo State University; 2021.

ABSTRACT

Objective: Evaluate the influence of whitening gel volume on color change (ΔE), whitening index (ΔWid) and hydrogen peroxide diffusion (PH), inflammatory response and pulp oxidative stress. **Materials and methods:** *In vitro* - 60 bovine teeth divided into 4 groups, according to gel volume (n = 15): SG - no treatment; V30 - 30 μL of 35% HP; V60 - 60 μL ; V120 - 120 μL . The HP diffusion analysis was performed in the 1st session (T1) and the chromatic change analyzes were performed after T1, 2nd (T2), 3rd (T3) sessions and 15 days (T4) after treatment. Data were submitted to ANOVA and Tukey Test ($\alpha < 0.05$). *In vivo* - 20 rats were distributed into 4 groups (n = 10), according to gel volume: Control – no treatment; V2 - 2 μL of 17.5% HP; V4 - 4 μL and V8 - 8 μL . After 24 hours, the animals were euthanized and the jaws processed for histological and immunohistochemical (nitric oxide) evaluation. Data were submitted to Wilcoxon and Mann-Whitney tests ($\alpha < 0.05$). **Results:** It was observed that ΔE and Wid were not influenced by volume. PH diffusion, inflammatory response and oxidative stress were proportional to volume. **Conclusion:** Bleaching efficacy is not proportional to volume while oxidative damage is. **Clinical relevance:** A smaller volume of gel is safer for treatment and has the same bleaching efficacy as larger volumes.

Keywords: Tooth bleaching. Oxidative stress. Nitric oxide. Dosage. Hydrogen peroxide.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Representação da distribuição dos grupos experimentais de acordo com o volume de gel clareador e tempos de análise.	17
Figura 2	Imagens representativas do infiltrado inflamatório.	29
Figura 3	Imagens representativas da análise imunoistoquímica de óxido nítrico sintase 24 horas após o tratamento clareador.	32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Média (desvio padrão) dos valores da alteração cromática (ΔE) obtidos de acordo com o volume de gel utilizado.	25
Tabela 2	Média (desvio padrão) dos valores de ΔWI_D do clareamento dental.	25
Tabela 3	Média (desvio padrão) da concentração de peróxido ($\mu g / mL$) permeado pelos tecidos dentais após o tratamento clareador com diferentes volumes de gel.	26
Tabela 4	Mediana e valores de “ p ” atribuídos ao infiltrado inflamatório no tecido pulpar com diferentes volumes de gel.	28
Tabela 5	Mediana e valores de “ p ” atribuídos à marcação imunoistoquímica do óxido nítrico no tecido pulpar com diferentes volumes de gel.	31

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	MATERIAIS E MÉTODOS	15
2.1	Delineamento experimental – In Vitro	15
2.2	Delineamento experimental – In Vivo	20
3	RESULTADOS	25
4	DISCUSSÃO	33
5	CONCLUSÃO	37
	REFERÊNCIAS	38
	ANEXOS	44

1 INTRODUÇÃO*

Apesar do clareamento dental ser realizado há mais de cem anos [1], as técnicas clareadoras foram impulsionadas após a proposta do tratamento caseiro, em 1989 [2]. Este período coincide cronologicamente com a valorização da estética facial, que tem como um dos elementos centrais a presença de dentes alinhados, com formas harmônicas e claros. A partir de então, várias técnicas e produtos foram desenvolvidos com o intuito de potencializar os resultados clareadores, principalmente empregando-se produtos altamente concentrados, indicados nas técnicas de consultório (*in-office*) [1]. No entanto, esta técnica gera questionamentos, especialmente com relação à demasiada ocorrência de sensibilidade dentária pós-operatória e às alterações pulpares [10-12].

O clareamento dental é um procedimento que altera as propriedades ópticas dos tecidos dentários, tais como a cor, translucidez e a fluorescência [13]. Sabe-se que em decorrência de seu baixo peso molecular, as espécies reativas de oxigênio (EROs) formadas a partir do peróxido de hidrogênio (PH) dos produtos clareadores, difundem-se através do esmalte e dentina e oxidam os agentes cromóforos, o que resulta em dentes com tonalidades mais claras [1, 3, 4, 14-16].

Todavia, estudos demonstram que durante este processo, parte destas EROs alcançam o complexo dentino-pulpar [16, 17], suscitando efeitos adversos que vão desde processo inflamatório leve no tecido pulpar até necrose tecidual [18-22]. É possível que a grande ocorrência de sensibilidade trans ou pós-operatória em pacientes submetidos ao clareamento *in-office* esteja relacionada a este fenômeno [21, 23].

O estresse oxidativo no tecido pulpar pode estimular a síntese e a liberação de mediadores bioquímicos [18, 24], como o óxido nítrico (NO, do inglês *nitric oxide*), principal mediador citotóxico de células imunes efectoras, que é produzido a partir da L-arginina, por uma reação mediada pela enzima NO-sintase constitutiva e induzível, constituindo a mais importante molécula reguladora do sistema imune [25]. Assim, uma forma indireta de se avaliar o estresse oxidativo seria através da imunomarcagem para NO, oportunizando a correlação entre o nível de estresse oxidativo com a quantidade de PH difundida [26].

* Formatado de acordo com as normas da Clinical Oral Investigations
<https://www.springer.com/journal/784/submission-guidelines>

Estudos prévios mostraram que o número de sessões clareadoras influencia nas alterações do tecido pulpar em dentes de ratos, onde o aumento do número de sessões resultou em aumento na extensão e a intensidade das alterações pulpares [22]. Da mesma forma, o aumento do tempo de permanência do gel clareador e de sua concentração também intensificou os danos pulpares. Assim, é possível que o volume de gel disponibilizado também influencia no dano ao tecido pulpar, o que ainda não foi avaliado.

Não obstante, embora o clareamento seja um tratamento dose-dependente, não existem investigações científicas específicas ou indicações precisas em bulas com relação à dose/volume de produto a ser aplicado sobre a estrutura dentária. É necessário conhecer o efeito do volume de gel clareador no sucesso do tratamento, uma vez que a possibilidade de manter a eficácia, utilizando posologias mais amenas poderia representar avanços consideráveis na resposta biológica a este procedimento.

Desta forma, o objetivo deste estudo foi avaliar a influência do volume de gel clareador na eficácia clareadora ao longo do tempo, na penetração trans-amelodentinária de PH e na resposta inflamatória e celular específica ao estresse oxidativo no tecido pulpar após o tratamento clareador, tendo como hipóteses nulas que (1) o volume de gel clareador não influenciaria na alteração cromática e na eficácia clareadora; (2) o volume de gel clareador não influenciaria na penetração trans-amelodentinária de PH; (3) o volume do gel clareador não influenciaria na resposta inflamatória no tecido pulpar e (4) o volume do gel clareador não influenciaria na resposta celular específica ao estresse oxidativo no tecido pulpar.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Delineamento experimental – *In Vitro*

O projeto apresentou dois fatores em estudo:

Volume do gel clareador, em 4 níveis:

- a. Ausência de gel;
- b. 30 μ L;
- c. 60 μ L;
- d. 120 μ L.

Tempos de análise em 4 níveis, considerando a alteração em relação ao T0 (Delta):

- a. T1- após a primeira sessão clareadora;
- b. T2- após a segunda sessão clareadora;
- c. T3- após a terceira sessão clareadora;
- d. T4- 15 dias após a finalização do tratamento.

Variáveis de Resposta:

- a. Alteração cromática;
- b. Penetração trans-amelodentinária.

Obtenção e seleção das amostras

O projeto foi submetido à Comissão de Ética em Pesquisa Animal da Faculdade de Odontologia de Araçatuba (Unesp) (Processo ARAC/FO 547/2019 Vol.1) e as intervenções só foram realizadas após a sua aprovação. Inicialmente, foram obtidos 120 incisivos bovinos permanentes oriundos de animais com idade entre 24 e 30 meses. Após a extração, os dentes foram limpos mecanicamente utilizando curetas periodontais e submetidos à profilaxia com pedra pomes e água. Aqueles que apresentaram alterações morfológicas na coroa e trincas no

esmalte manchas ou desgastes excessivos das incisais não foram selecionados. Para evitar a proliferação bacteriana foram armazenados em solução salina fisiológica, contendo timol a 0,1% e mantidos em refrigerador em temperatura aproximada a 4°C, até o início da fase experimental [10].

Os dentes tiveram as raízes separadas das coroas na junção amelo-cementária e, posteriormente, as coroas foram fixadas à plataforma de uma furadeira de bancada (FGC-16, Ferrari, São Paulo, SP, Brasil). Com auxílio de uma ponta diamantada para corte de vidro de 8 mm de diâmetro (Dinser Diamond Tools Ltda, Sacomã, SP, Brasil), sob constante irrigação, foram obtidos discos de esmalte/dentina com 5,7 mm de diâmetro [10].

Os discos tiveram a superfície dentinária regularizada por meio de movimentos giratórios manuais sobre lixas de óxido de alumínio de granulação 600 (T469-SF-Noton, Saint-Gobain Abrasives Ltda, Jundiaí, SP, Brasil), até apresentarem a espessura de 3,7 mm (1,3 mm de esmalte e 2,4 mm de dentina, $\pm 0,2$ mm), aferidos em paquímetro digital (500-144B, Mitutoyo Sul América Ltda, SP, Brasil). Para remoção da *smear layer* foi aplicada solução de EDTA 0.5M, pH 7,2 por 30 segundos, sobre a superfície de dentina, seguido de rinsagem com água deionizada [10].

Os fragmentos foram posicionados sobre uma matriz de silicone preta, contendo perfurações com 5,7 mm de diâmetro e 3,7 mm de espessura (similar ao espécime), o que possibilitou o encaixe das amostras [10]. Os discos dentários foram então submetidos à leitura do valor de E^* em espectrofotômetro de reflexão ultravioleta visível (UV-2450, Shimadzu, Kyoto, Japão), que utiliza o sistema de cores Cielab, sendo constituído pelos eixos que definem a cor: L^* , a^* e b^* . A coordenada L^* (luminosidade) refere-se à variação entre o branco ($L^*=100$) e o preto ($L^*=0$); a coordenada a^* varia de -90 a +70 e refere-se à escala de verde a vermelho, com valores negativos para as cores esverdeadas e positivo para as cores avermelhadas; e a coordenada b^* varia de -80 a +100 e refere-se à escala de azul a amarelo, com valores negativos para as cores azuladas e positivo para as cores amareladas [35].

O valor inicial E^* foi calculado através da fórmula:

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

Uma vez obtidos os valores, foram selecionados os 60 blocos dentários que apresentaram valores mais baixos da amostragem, com tolerância de 5% (média = 66,73 e desvio padrão = 0,10).

Produto clareador

O gel clareador de escolha foi o Whiteness HP Maxx (FGM, Produtos Odontológicos, Joinville, SC, Brasil) à base de PH a 35%. O produto é apresentado em dois frascos, sendo um contendo o PH e o outro, o agente espessante. Ambas substâncias foram misturadas na proporção de 3:1 e manipuladas segundo as instruções do fabricante para obter o gel [24].

Distribuição dos grupos experimentais

Os espécimes foram aleatoriamente divididos em 4 grupos experimentais (n=15), de acordo com o volume de gel clareador a ser utilizado, conforme descrito a seguir e ilustrado na Figura 1.

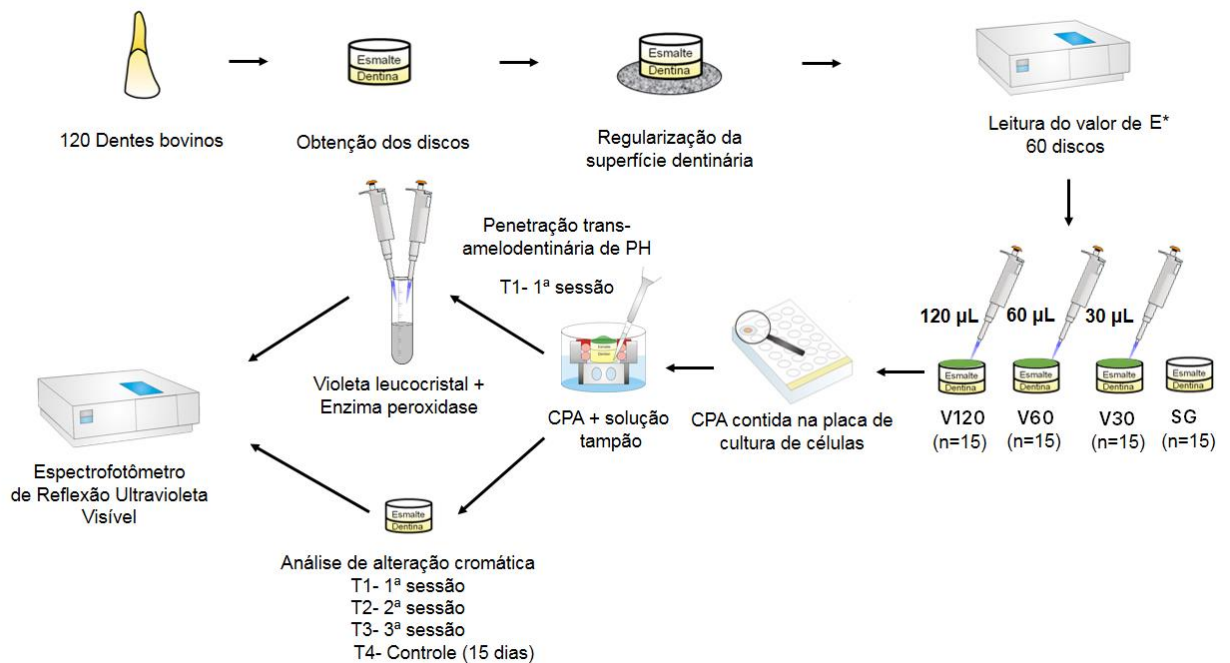


Figura 1 Representação da distribuição dos grupos experimentais de acordo com o volume de gel clareador e tempos de análise

Grupo Sem Gel (SG; controle) – Os espécimes não receberam gel clareador durante toda a fase experimental.

Grupo Volume 30 (V30) – Os espécimes receberam 30µL do PH a 35%. O gel manipulado foi inserido em uma pipeta própria para líquidos viscosos (Microman E M100E, Gilson, Inc, Middleton, Wisconsin, USA), que permitiu a dosagem precisa do produto. O gel foi aplicado sobre todo o esmalte do bloco de dente bovino, e permaneceu em contato por 45 minutos, em única aplicação [36]. Após, o gel foi removido com sugadores e papel absorvente e os espécimes foram lavados em água corrente. O procedimento foi repetido por mais 2 vezes, com intervalo de uma semana entre as sessões.

Grupo V60 – Os espécimes receberam aplicações de 60µL do produto clareador. A manipulação do gel, a forma e o tempo de aplicação, assim como o número de sessões, foram os mesmos descritos no Grupo V30.

Grupo V120 – Todos os espécimes receberam aplicações de 120µL, como descrito anteriormente.

Os espécimes permaneceram armazenados em câmaras umidificadoras no intervalo entre as sessões até a última análise de alteração cromática e eficácia clareadora.

Avaliação da alteração cromática

A análise da alteração cromática foi realizada 24 horas após o término de cada sessão clareadora, nos tempos T1, T2, T3 e T4 em espectrofotômetro de reflexão ultravioleta visível. O cálculo do ΔE foi realizado pelo sistema CIELAB*, através da fórmula: $\Delta E = [(\Delta L)^2 + (\Delta a)^2 + (\Delta b)^2]^{1/2}$.

Índice de clareamento

A análise de alteração cromática foi complementada pelo índice de clareamento baseado também nos eixos avaliados no sistema CIELAB*, possibilitando evidenciar especificamente o efeito clareador do tratamento. Os valores positivos resultantes do índice WID indicam maior efeito clareador e os valores baixos e/ou negativos indicam menor efeito clareador, tratando-se de uma formulação linear simples obtida através da seguinte fórmula: $WID = (0,511 \times L^*) - (2,324 \times a^*) - (1,100 \times b^*)$ [37].

Penetração trans-amelodentinária de PH

Preparo da Câmara pulpar artificial (CPA)

A análise da difusão trans-amelodentinária de PH foi realizada somente na primeira sessão clareadora. Para tanto, as amostras foram posicionadas em câmaras pulpares artificiais (CPAs), sendo adaptadas em seu compartimento superior entre 2 anéis de silicone, que mantiveram os discos fixados às CPAs [38]. Cada CPA apresenta 2 compartimentos: o da porção superior, apresenta uma abertura de 8 mm de diâmetro, e outra abaixo com 6 mm de abertura, permitindo o posicionamento e travamento adequado do espécime; a porção inferior apresenta perfurações laterais que permitem a circulação da solução utilizada para quantificar o peróxido difundido no espécime.

Preparo das soluções e quantificação da difusão de PH

Com os espécimes já montados nas CPAs, foi adicionado 1 mL do tampão de acetato, formado por soluções previamente manipuladas de acetato de sódio 2M e ácido acético 2M, com pH ajustado para 4,5 [38]. A solução preenche a porção inferior das CPA, de tal forma que permanece em contato com a superfície dentinária durante o período em que o gel clareador permanece em contato com a superfície do esmalte, permitindo sua estabilização na solução tampão [15].

Após a aplicação e remoção do gel, e aguardados 30 minutos, foram coletados 0,25µL da solução contida no interior das CPAs e adicionadas à solução de violeta leucocristal (0,5 mg/mL; Sigma Chemical Co, St Louis, MO, EUA) e enzima peroxidase (1 mg/mL; Sigma Chemical Co, St Louis, MO, EUA). Este método baseia-se na reação do PH com o corante violeta leucocristal, catalizado pela enzima peroxidase [39]. A coloração dessa mistura varia de intensidade de acordo com a quantidade de peróxido difundida.

As análises das soluções padrão e das soluções obtidas nas CPA foram realizadas no espectrofotômetro de reflexão ultravioleta visível* (UV-2450, Shimadzu) sob comprimento de onda de 596 nm. Os dados obtidos permitiram a criação de um gráfico de absorbância × concentração, que determinou a quantificação do PH difundido através da estrutura dentária e estabilizado no interior da CPA.

2.2 Delineamento experimental – *In Vivo*

O projeto apresentou dois fatores em estudo:

Volume do gel clareador, em 4 níveis:

- a. Ausência de gel;
- b. 2 μ L;
- c. 4 μ L;
- d. 8 μ L.

Variáveis de Resposta:

- a. Resposta inflamatória pulpar;
- b. Resposta celular específica ao estresse oxidativo no tecido pulpar.

Animais

O projeto foi submetido à Comissão de Ética em Pesquisa Animal da Faculdade de Odontologia de Araçatuba (Unesp) (Processo ARAC/FO 547/2019 Vol.1) e as intervenções só foram realizadas após a sua aprovação. Foram utilizados 20 ratos Wistar (*Rattus albinus*), machos, com peso de aproximadamente 250 g, oriundos do biotério da Universidade Estadual Paulista (UNESP). Os animais foram mantidos em temperatura entre 22°C e 24°C, ciclo de luz controlada (12 horas claro e 12 horas escuro), recebendo dieta sólida e água à vontade (4 ratos/gaiola) [18].

Produto clareador

Foi utilizado gel clareador à base de PH 17,5%, obtido através da diluição do gel à base de PH 35% (Whiteness HP Maxx, FGM - Produtos Odontológicos, Joinville, SC, Brasil) que tem apresentação comercial em dois frascos, sendo um contendo o PH e o outro, o agente

espessante. O gel de PH 17,5% foi obtido utilizando a proporção de 3:3:2, sendo 3 gotas de peróxido de hidrogênio, 3 gotas de água destilada e 2 gotas de agente espessante [24].

Distribuição dos sítios experimentais

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em 2 sítios experimentais representados pelas hemi-maxila direita e esquerda. Os tratamentos foram realizados de forma aleatória, sendo realizado um sorteio prévio para escolha de qual volume de gel clareador seria utilizado em cada hemi-maxila (sem gel, 2 μ L, 4 μ L e 8 μ L).

Protocolo sedativo e anestesia

Os animais receberam, via intramuscular, uma associação do sedativo Cloridrato de Xilazina 2% (Syntec do Brasil LTDA, Cotia, São Paulo, Brazil) na dosagem de 10 mg/kg e Cloridrato de Quetamina 10% (União Química Farmacêutica Nacional S/A, Embu-Guaçu, São Paulo, Brazil), na dosagem 80 mg/Kg, para causar efeito anestésico e sedativo [27].

Tratamento clareador

Após a anestesia, foram realizadas as sessões clareadoras para cada grupo experimental, conforme descrito a seguir.

Grupo Controle: Os molares superiores não receberam nenhum tipo de tratamento clareador.

Grupo V2: Com o auxílio de uma pipeta para líquidos viscosos (Microman E M100E, Gilson, Inc, Middleton, Wisconsin, USA), foram aplicados sobre os molares superiores 2 μ L do gel à base de PH 17,5%, permanecendo em contato com a estrutura dentária por 10 minutos. Em seguida, os dentes foram limpos com algodão e papel absorvente e lavados abundantemente com água.

Grupo V4: De forma análoga, foram aplicados sobre os molares superiores 4 μ L do gel à base de PH 17,5%, permanecendo em contato com a estrutura dentária por 10 minutos.

Grupo V8: Foram aplicados sobre os molares superiores 8 μ L do gel à base de PH 17,5%, permanecendo em contato com a estrutura dentária por 10 minutos.

O tempo e a concentração foram determinados por estudos previamente publicados [18, 40] e testes piloto, que apontaram que esta posologia não geraria necrose e dissolução pulpar no tratamento com o volume médio de gel (4uL).

Etapas laboratoriais

Os animais foram eutanasiados 24 horas após o término dos tratamentos clareadores, através de overdose do anestésico Tiopental sódico, via intraperitoneal (150 mg/Kg; Thipentax, Cristália - Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda, Itapira, Brasil) [10]. As hemimaxilas foram separadas, dissecadas e fixadas em solução de formalina tamponada a 4%, por 24 horas. Os espécimes foram descalcificados em solução de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) a 10% (pH = 7), por aproximadamente 3 meses, e depois desidratados, clarificados e embebidos em parafina [27].

O micrótomo de deslizamento (Leica Microsystems - RM 2045, Wetzlar, Germany) foi utilizado para realização da microtomia, obtendo cortes semisseriados com 5 µm de espessura, no sentido vestibulo-palatino e coletados em lâminas silanizadas. Os cortes foram selecionados a partir do momento em que a raiz mesial fosse visível em seu sentido longitudinal pleno. As 3 primeiras lâminas obtidas foram submetidas à coloração com hematoxilina-eosina (H.E.) e os próximos 3 lâminas foram submetidas à análise imunoistoquímica pela técnica da imunoperoxidase indireta [26], para anti-óxido nítrico sintase.

Para a reação imunoistoquímica, os cortes histológicos foram desparafinizados em xilol e hidratados em série decrescente de etanol (100°- 100°- 100°- 90°- 70° GL). A recuperação antigênica foi realizada através da imersão das lâminas histológicas em tampão Diva Decloaker® (Biocare Medical, CA, USA), em câmara pressurizada Decloaking Chamber® (Biocare Medical, CA, USA), a 95°C, por 10 minutos. Após lavagens em 0,1M, pH 7,4, as lâminas histológicas foram imersas em 3% de PH, por 1 hora, para o bloqueio da peroxidase endógena. Após lavagens em PBS, os cortes histológicos foram tratados com 3% de soro albumina bovino por 12 horas, para bloqueio dos sítios inespecíficos [18, 27].

As lâminas histológicas foram submetidas à incubação com o anticorpo primário anti-ONS (anticorpo de rato gerado em coelho, LS-B3657-250, LifeSpan BioSciences, WA, USA). Este anticorpo primário foi diluído em PBS acrescido de 0,1% Triton X-100 (PBS-TX), durante 24 horas, em câmara úmida. Nas etapas subsequentes foi utilizado o Universal Dako Labeled

Streptavidin-Biotin Kit® (Dako Laboratories, CA, USA). Após lavagens, as secções foram incubadas no anticorpo secundário biotilado, durante 2 horas, lavadas e tratadas com estreptavidina conjugada com a peroxidase da raiz forte, por 1 hora. Depois de três lavagens em PBS-TX foi realizada a revelação utilizando-se como cromógeno o 3,3'- tetracloridrato de diaminobenzidina (DAB chromogen Kit®, Dako Laboratories, CA, USA). Ao término de uma série de lavagens em PBS, os cortes histológicos foram contra-corados com hematoxilina de Harris. Como controle negativo, os espécimes foram submetidos aos mesmos procedimentos suprimindo-se a utilização dos anticorpos primários [18, 27].

Análise da resposta inflamatória pulpar

Foi utilizado microscópio óptico (DM 4000 B, Leica®, Germany) para análise histológica, avaliando-se os parâmetros através de escores que foram atribuídos em cada terço da coroa (oclusal, médio e cervical) [18]:

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

Análise do marcador de oxido-nítrico

A análise foi definida avaliando-se a presença de coloração acastanhada no citoplasma das células e na matriz extracelular, em cada terço da câmara pulpar. Os escores atribuídos em cada terço da coroa (oclusal, médio e cervical) foram:

- 1 – Baixo padrão de imunomarcção;
- 2 – Moderado padrão de imunomarcção;
- 3 – Severo padrão de imunomarcção.

Análise estatística

O software Sigma Plot (Systat, San Jose, CA, USA) foi utilizado para realização da análise estatística. Para as análises das alterações cromáticas (ΔE) e eficácia clareadora (ΔWI_D) os dados foram submetidos ao teste ANOVA 2 fatores medidas repetidas e os dados de difusão de PH foram submetidos ao teste ANOVA 1 fator. Em seguida, o teste Tukey foi utilizado para comparações ($\alpha < 0,05$).

Para as comparações estatísticas da resposta inflamatória e imunomarcção de óxido-nítrico foram utilizados testes não-paramétricos de Wilcoxon para as análises pareadas (CONT×2 μ L, e 4 μ L×8 μ L) e Mann-Whitney para as análises não-pareadas (CONT×4 μ L, CONT×8 μ L, 2 μ L×4 μ L e 2 μ L×8 μ L). Para todos os testes foi adotado o nível de significância de 5%.

3 RESULTADOS

In Vitro

Análise da alteração cromática (ΔE)

A Tabela 1 mostra que a alteração de cor foi independente do volume utilizado, sendo observado que apenas SG apresentou valores inferiores aos demais grupos em todos os tempos analisados ($p < 0,05$). Quando analisado o comportamento dos grupos a cada sessão clareadora e após 15 dias (T4), observou-se que SG e V120 mantiveram seus valores inalterados desde a primeira sessão (T1), sem apresentar variações até o término do tratamento. Em contrapartida, os grupos V30 e V60 apresentaram os maiores valores somente após a segunda semana de clareamento.

Tabela 1 Média ($\pm$ desvio padrão) dos valores da alteração cromática (ΔE) do clareamento dental

Grupos	T1	T2	T3	T4
SG	2,46 ($\pm$ 1,69) Ba	2,34 ($\pm$ 2,21) Ba	3,16 ($\pm$ 2,60) Ba	3,28 ($\pm$ 2,24) Ba
V30	5,35 ($\pm$ 1,60) Ab	6,67 ($\pm$ 1,99) Aa	5,72 ($\pm$ 2,56) Aab	6,60 ($\pm$ 1,90) Aa
V60	5,00 ($\pm$ 1,50) Ab	6,06 ($\pm$ 2,02) Aab	5,90 ($\pm$ 2,68) Aab	6,86 ($\pm$ 2,56) Aa
V120	5,85 ($\pm$ 1,48) Aa	6,09 ($\pm$ 2,27) Aa	6,16 ($\pm$ 2,75) Aa	6,87 ($\pm$ 2,53) Aa

* Letras maiúsculas e minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os grupos em cada período avaliado, e dentro de cada grupo nos diferentes períodos avaliados, respectivamente ($p < 0,05$).

Eficácia clareadora - Índice de clareamento (ΔWI_D)

De forma semelhante, a Tabela 2 mostra que o volume de gel não influenciou na obtenção do efeito clareador, que foi igualmente eficaz em todos os grupos e períodos, diferindo do grupo controle ($p < 0,001$). Ao analisar o comportamento dos grupos ao longo do tempo, observa-se que apesar das oscilações temporárias, o resultado obtido após a primeira sessão clareadora (T1) foi semelhante ao observado no final do experimento (T4), em todos os grupos.

Tabela 2 Média ($\pm$ desvio padrão) dos valores de ΔWI_D do clareamento dental

	<i>T1</i>	<i>T2</i>	<i>T3</i>	<i>T4</i>
<i>SG</i>	-1,31 ($\pm$ 1,68) Bab	-0,45 ($\pm$ 1,78) Ba	-1,81 ($\pm$ 1,18) Bab	-2,15 ($\pm$ 2,46) Bb
<i>V30</i>	3,92 ($\pm$ 3,13) Ab	5,50 ($\pm$ 1,93) Aa	3,55 ($\pm$ 3,90) Ab	4,73 ($\pm$ 3,23) Aab
<i>V60</i>	3,83 ($\pm$ 3,54) Aa	3,39 ($\pm$ 3,39) Aa	3,56 ($\pm$ 3,69) Aa	4,23 ($\pm$ 3,99) Aa
<i>V120</i>	5,51 ($\pm$ 3,23) Aab	4,24 ($\pm$ 3,77) Ab	4,70 ($\pm$ 3,61) Aab	6,07 ($\pm$ 3,91) Aa

*As letras maiúsculas comparam entre as linhas (volume de gel) e as minúsculas comparam as colunas (tempos de análise).

Análise da penetração trans-amelodentinária de PH

A Tabela 3 apresenta o valor médio da concentração de H₂O₂ que permeou o tecido dentário. Constata-se que o grupo controle (SG) apresentou os menores valores, diferindo estatisticamente dos demais ($p < 0,001$). Houve diferença significativa entre os valores de penetração de PH em todos os grupos ($p < 0,001$), onde o grupo que recebeu a aplicação do volume de 120 μ L de gel clareador (V120) apresentou os maiores valores, seguidos pelos grupos de 60 μ L (V60) e de 30 μ L (V30).

Tabela 3 Média ($\pm$ desvio padrão) da concentração de PH (μ g/mL) permeado pelos tecidos dentais após o tratamento clareador, segundo os grupos

<u>Grupos</u>	<u>Penetração do PH</u>
<i>SG</i>	0,101 (0,10) D
<i>V30</i>	0,849 (0,35) C
<i>V60</i>	1,142 (0,42) B
<i>V120</i>	1,782 (0,30) A

*As letras diferentes (maiúsculas nas linhas) indicam diferença estatisticamente significante ($p < 0,05$).

In Vivo

Análise do infiltrado inflamatório

As imagens representativas do infiltrado inflamatório são mostradas na Figura 3 e os resultados na Tabela 4. No terço oclusal observou-se que o grupo que não recebeu aplicação do gel clareador (controle) diferiu estatisticamente dos demais, apresentando tecido pulpar em normalidade, com ausência de inflamação ($p = 0,002$). O grupo V2 também apresentou menor infiltrado inflamatório que V4 e V8 ($p=0,009$ e $p<0,001$, respectivamente). Já V4 e V8 foram semelhantes (valor de p), onde foram observadas áreas de necrose no grupo V8 e infiltrado inflamatório severo no grupo V4 ($p > 0,05$).

No terço médio, apesar dos grupos que receberam a aplicação do gel clareador apresentarem infiltrado inflamatório discreto em comparação ao grupo controle, que apresentou ausência de células inflamatórias, o grupo V2 diferiu também significativamente de V8 ($p = 0,011$). No terço cervical todos os grupos apresentaram um tecido pulpar organizado e ausência de células inflamatórias ($p = 1,000$).

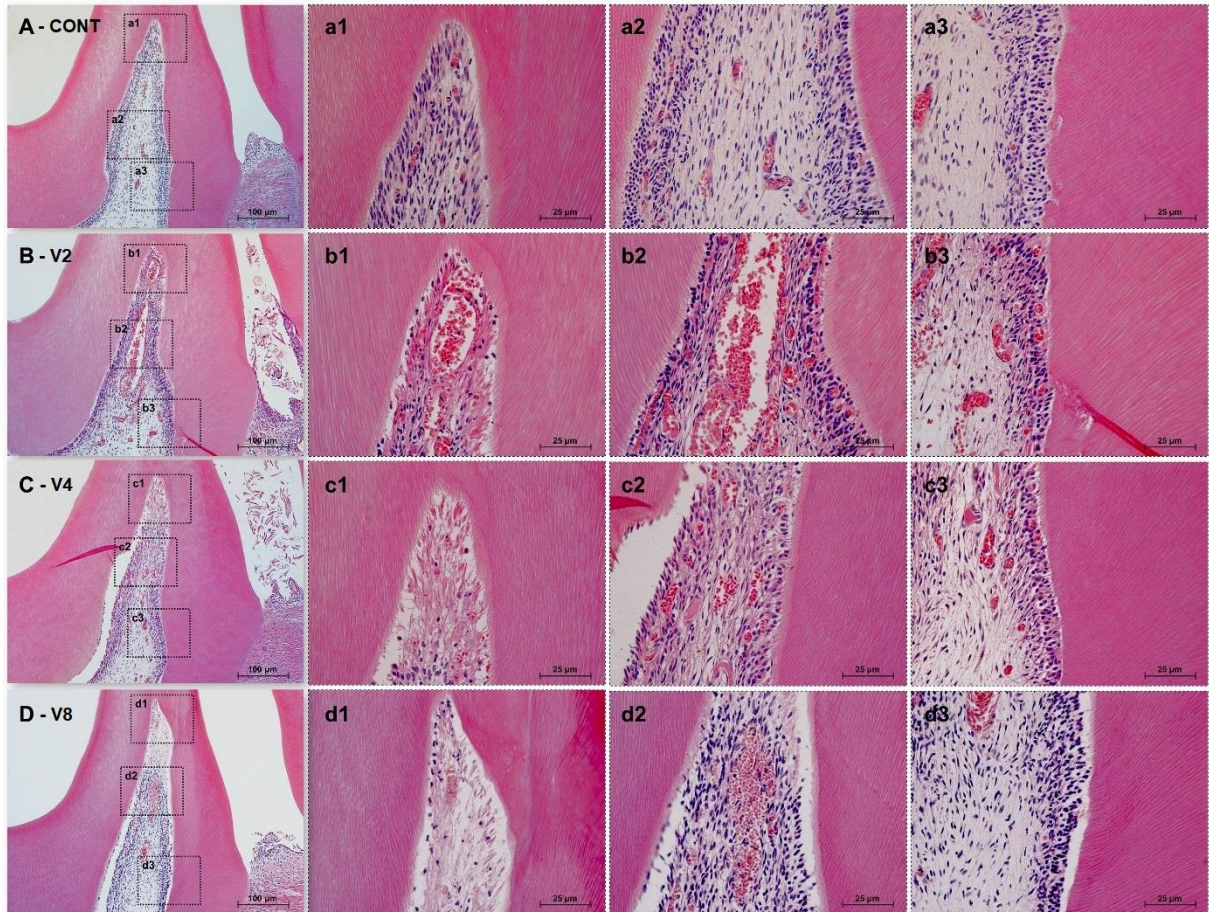
Tabela 4 Mediana e valores de “p” atribuídos ao infiltrado inflamatório no tecido pulpar com diferentes volumes de gel

Terços da polpa coronária	Escore	24 h			
		Controle	V2	V4	V8
Oclusal	1	10/10	0/10	0/10	0/10
	2	0/10	3/10	0/10	0/10
	3	0/10	5/10	3/10	1/10
	4	0/10	2/10	3/10	3/10
	5	0/10	0/10	4/10	6/10
	Mediana	1	3	4	5
	valor p		*Controle×V2= 0,002 V4×V8 = 0,063 *V2×V4 = 0,009 *V2×V8 = <0,001 *Controle×V4 = 0,002 *Controle×V8 = 0,002		
Médio	1	10/10	3/10	0/10	0/10
	2	0/10	7/10	7/10	6/10
	3	0/10	0/10	3/10	4/10
	4	0/10	0/10	0/10	0/10
	5	0/10	0/10	0/10	0/10
	Mediana	1	2	2	2
	valor p		*Controle×V2= 0,016 V4×V8= 0,681 V2×V4 = 1,000 *V2×V8 = 0,011 *Controle×V4 = 0,016 *Controle×V8 = 0,016		
Cervical	1	10/10	10/10	10/10	10/10
	2	0/10	0/10	0/10	0/10
	3	0/10	0/10	0/10	0/10
	4	0/10	0/10	0/10	0/10
	5	0/10	0/10	0/10	0/10
	Mediana	1	1	1	1
	Valor p		Controle×V2= 1,000 V4×V8= 1,000 V2×V4 = 1,000 V2×V8 = 1,000 Controle×V4 = 1,000 Controle×V8 = 1,000		

Controle×V2 e V4×V8 = Teste de Wilcoxon ($p < 0.05$); V2×V4, V2×V8, controle×V4 e controle×V8 = Teste de Mann-Whitney ($p < 0.05$). *Os asteriscos destacam a diferença significativa entre os grupos.

Figura 3 Imagens representativas do infiltrado inflamatório. (A) – CONTROLE: Células inflamatórias ausentes nos terços oclusal (a1), médio (a2) e cervical (a3). (B) – V2: Áreas de

infiltrado inflamatório moderado à ausente, moderado (b1), discreto (b2) e ausente (b3). (C) – V4: Infiltrado inflamatório de severo à ausente, (c1) severo, (c2) discreto e (c3) ausente. (D) – V8: Áreas de necrose (d1), infiltrado inflamatório moderado (d2) e ausente (d3). [Coloração de hematoxilina-eosina – 100× e 400×]



Análise do óxido-nítrico

As imagens representativas da marcação imunológica de óxido nítrico estão apresentadas na Figura 4 e os dados na Tabela 5. No terço oclusal, todos os grupos que receberam a aplicação do gel clareador diferiram significativamente do grupo controle, que apresentou baixo padrão de imunomarkação ($p < 0,05$). Além disso, o grupo V2, que recebeu apresentou moderado padrão de imunomarkação, diferiu estatisticamente dos grupos V4 e V8 ($p < 0,001$), os quais apresentaram marcação severa e foram semelhantes entre si ($p = 1,000$).

No terço médio, todos os grupos que receberam a aplicação do gel clareador também diferiram significativamente do grupo controle, que apresentou baixo padrão de

imunomarcação ($p < 0,05$). Os grupos V2 e V4 foram semelhantes e apresentaram resultados intermediários, enquanto que o grupo V8 apresentou severa imunomarcação, diferindo estatisticamente dos demais grupos (valor de p).

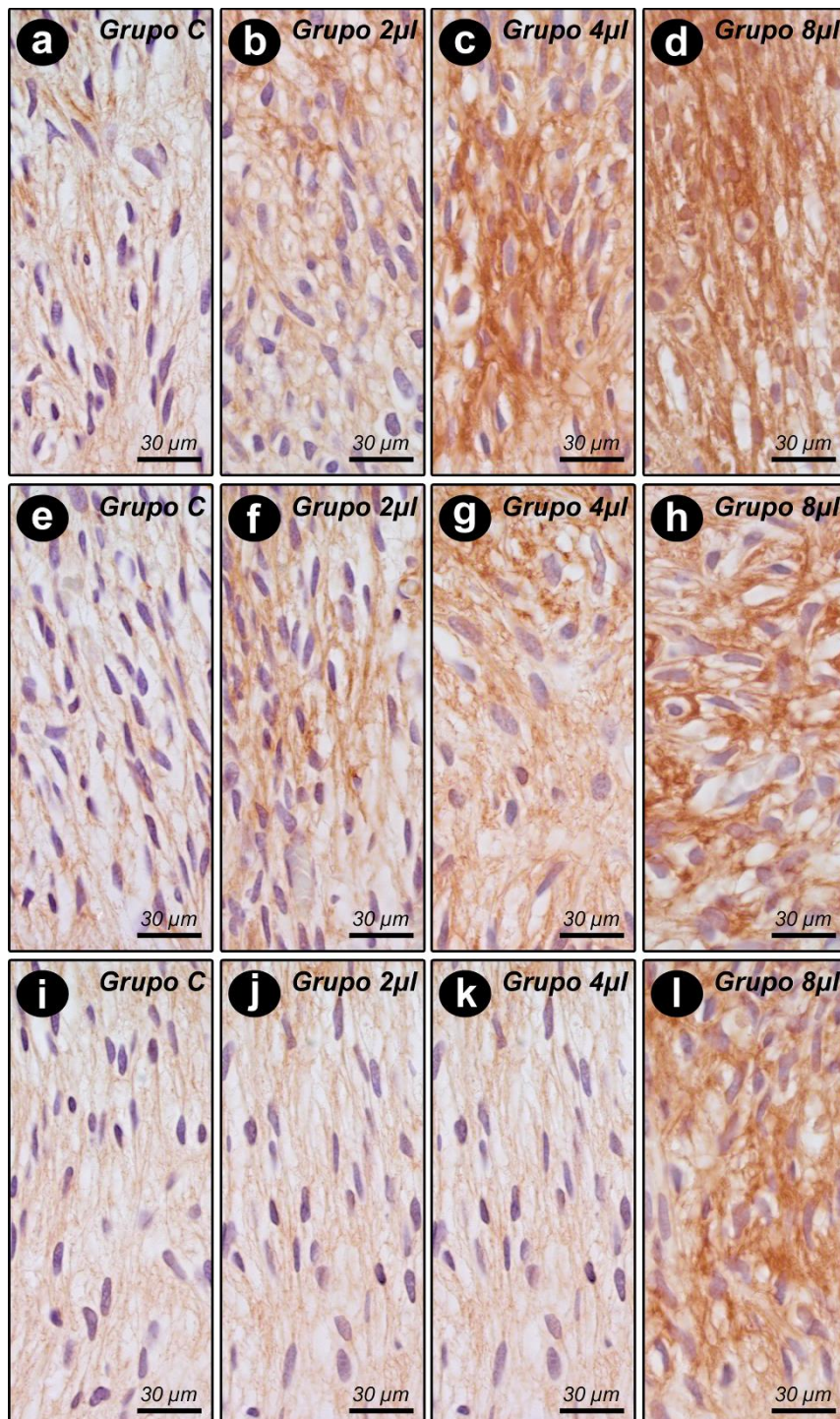
No terço cervical, apenas o grupo V8 apresentou severa imunomarcação e diferiu estatisticamente dos grupos controle, V2 e V4 (valor de p).

Tabela 5 Mediana e valores de “*p*” atribuídos à marcação imunoistoquímica do óxido nítrico no tecido pulpar com diferentes volumes de gel

Terços da polpa coronária	Escore	24 h			
		Controle	V2	V4	V8
Oclusal	1	10/10	0/10	0/10	0/10
	2	0/10	8/10	0/10	0/10
	3	0/10	2/10	10/10	10/10
	Mediana	1	2	3	3
	valor <i>p</i>		*Controle×V2= 0,002 V4×V8= 1,000 *V2×V4 = <0,001 *V2×V8 = <0,001 *Controle×V4 = <0,001 *Controle×V8 = <0,001		
Médio	1	10/10	0/10	0/10	0/10
	2	0/10	10/10	10/10	0/10
	3	0/10	0/10	0/10	10/10
	Mediana	1	2	2	3
	valor <i>p</i>		*Controle×V2= 0,002 *V4×V8= 0,002 V2×V4 = 1,000 *V2×V8 = <0,001 *Controle×V4 = <0,001 *Controle×V8 = <0,001		
Cervical	1	10/10	10/10	10/10	3/10
	2	0/10	0/10	0/10	7/10
	3	0/10	0/10	0/10	0/10
	Mediana	1	1	1	2
	Valor <i>p</i>		Controle×V2= 1,000 *V4×V8= 0,016 V2×V4 = 1,000 *V2×V8 = 0,002 Controle×V4 = 1,000 *Controle×V8 = 0,002		

Controle×V2 e V4×V8 = Teste de Wilcoxon ($p < 0.05$); V2×V4, V2×V8, controle×V4 e controle×V8 = Teste de Mann-Whitney ($p < 0.05$). *Os asteriscos representam diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Figura 4 Imagens representativas da análise imunoistoquímica de óxido nítrico sintase, 24 horas após o tratamento clareador. Foi observado baixo padrão de imunomarcacão nos terços oclusal, médio e cervical no grupo Controle (Grupo C - a; e; i), padrão moderado de imunomarcacão nos terços oclusal, médio do grupo V2 (Grupo 2 μ L - b; f) e médio do grupo V4 (Grupo 4 μ L - g). Padrão severo de imunomarcacão foi observado em todos os terços do grupo V8 (Grupo 8 μ L - d; h; l) e no terço oclusal do grupo V4 (Grupo 4 μ L - c). [Imunoistoquímica de oxido nítrico sintase – 1000 $\times$]



4 DISCUSSÃO

Apesar do tratamento clareador ser considerado uma terapia dose-dependente [35, 41], o efeito do volume de gel clareador na eficácia do tratamento e na ocorrência de efeitos adversos ainda são desconhecidos. Neste estudo, observou-se que todos os grupos que receberam a aplicação do gel, independente do volume aplicado, apresentaram alterações significativas e semelhantes nas análises de ΔE . Também foi constatado que os tratamentos proporcionaram as maiores alterações cromáticas logo após as primeiras sessões, permanecendo inalteradas até o final do experimento. Dados semelhantes foram observados na análise do Wid, o que ratifica a maior importância das primeiras sessões no ganho estético esperado pelo tratamento clareador.

Em outras análises apresentadas na literatura, observou-se que a alteração cromática acontece continuamente até a terceira sessão clareadora. No entanto, no presente estudo empregou-se dentes bovinos sem pigmentação artificial e, por serem naturalmente claros, pode ter favorecido a saturação clareadora no início do tratamento. De toda forma, nos parâmetros avaliados neste estudo, o volume de gel clareador não influenciou na alteração cromática e no efeito clareador, sendo aceita a primeira hipótese nula.

De certa forma, esta efetividade é validada pelo estudo comparativo de Gerlach e colaboradores [42], que em um ensaio clínico randomizado duplo-cego, observaram que tiras de clareamento com uma camada fina de agente clareador obteve mesmo resultado que o conseguido pela técnica caseira.

As análises da efetividade das técnicas clareadoras normalmente contemplam as alterações cromáticas, bem como a ocorrência de sensibilidade dentária, que é relatada pela maior parte dos pacientes [1, 6, 23]. De forma indireta, no presente estudo, adotou-se a metodologia empregada por Mottola e colaboradores [39], aperfeiçoada pelo emprego das câmaras pulpares artificiais [24], que possibilitam conhecer *in vitro* a concentração de PH difundido através da estrutura dentária e estabilizada pela solução tampão que preenche as câmaras pulpares. A presença de peróxido de hidrogênio e outras espécies reativas na cavidade pulpar tem sido relacionada aos principais efeitos adversos das técnicas clareadoras [10-12, 15]. Os dados obtidos neste estudo mostraram que quanto maior o volume de gel aplicado, maior a penetração trans-amelodentinária de PH sendo negada a segunda hipótese nula do estudo.

Sabe-se que após a aplicação do gel clareador sobre o esmalte ocorre um desequilíbrio químico na região e, com o intuito de reestabelecer a condição de normalidade, o peróxido proveniente do gel clareador desloca-se para o local de menor concentração, ou seja, para o

interior da estrutura dentária. Os resultados obtidos sugerem que a maior disponibilidade de peróxido nos grupos que utilizam maior volume de gel intensifica este desequilíbrio, favorecendo a maior penetração na estrutura dentária. Uma parte destas EROs buscam a estabilidade ao reagirem com substâncias cromóforas e resultam no almejado efeito clareador. Porém, o efeito clareador não responde linearmente ao aumento da disponibilidade de peróxido, fazendo com que parcela considerável das EROs que não reagiram atinjam a cavidade pulpar [28].

Assim, apesar de vários estudos avaliarem os efeitos da utilização de terapias para sensibilidade dentária, antioxidantes ou até mesmo anti-inflamatórias [x43-45], parece que a redução do volume do produto utilizado na técnica também pode ser um auxiliar na prevenção desta sintomatologia, não prejudicando os resultados estéticos.

Estas constatações observadas nos testes *in vitro* foram validadas nas análises *in vivo*, uma vez que a utilização do maior volume de gel clareador acarretou em maiores alterações do tecido pulpar, sendo encontradas áreas de necrose e infiltrado inflamatório severo. Por outro lado, os molares que receberam o menor volume de gel clareador apresentaram apenas um infiltrado inflamatório moderado, negando, portanto, a terceira hipótese nula do estudo.

Vale destacar que nos testes *in vivo* optou-se por utilizar um tempo de permanência do gel clareador de 10 minutos sobre os molares [18], já que estudos prévios mostraram que este tempo seria suficiente para propiciar a avaliação das reações do tecido pulpar ao estresse oxidativo sem que ocorresse necrose total da polpa coronária. Outro fator importante está relacionado à concentração de PH escolhida para a realização dos testes *in vivo*, concentração esta, distinta e inferior à dos testes *in vitro*. Esta escolha também foi baseada na necessidade de obtenção de resultados mais brandos correlacionados ao processo inflamatório, principalmente sem que houvesse necrose tecidual, já que inúmeros estudos já avaliaram os efeitos promovidos por altas concentrações de peróxido [12,15,18].

Com relação à óxido nítrico sintase, é uma enzima chave na síntese do óxido nítrico e, consequentemente, alterações nos níveis desta enzima podem ser interpretadas como modulação nos níveis de óxido nítrico nos tecidos [51]. Na polpa dentária o óxido nítrico auxilia na manutenção da homeostase, participa da resposta inflamatória local e atua na reparação tecidual [52]. No presente estudo foi observado um padrão de imunomarcacão basal para óxido nítrico sintase no grupo controle, o que evidencia sua importância na manutenção da homeostase da polpa. Por outro lado, ao se aplicar diferentes volumes de gel à base de peróxido

de hidrogênio 17,5% observou-se que houve um aumento no padrão de imunomarcção do óxido nítrico sintase na polpa dentária, portanto negando a quarta e última hipótese nula do estudo, em que o volume de gel clareador não influenciaria na resposta celular específica ao estresse oxidativo após o tratamento.

O aumento no padrão e a localização da imunomarcção ao longo dos diferentes terços da polpa dentária se mostraram dependente do volume do gel clareador, ou seja, quanto maior o volume utilizado, maior foi o padrão e a extensão da imunomarcção na polpa dentária. Estes resultados mostram que a alteração na imunomarcção do óxido nítrico sintase é reflexo da participação do óxido nítrico no processo inflamatório resultante da aplicação do gel. O aumento no padrão e na extensão da imunomarcção para óxido nítrico sintase estão de acordo com o maior infiltrado inflamatório, o que corrobora outros estudos que mostram que dentre as principais fontes produtoras de óxido nítrico estão as células inflamatórias [53].

Vale destacar que Colares e colaboradores [54] também investigaram os níveis de H_2O_2 e NO após realização do clareamento dental em consultório, entretanto em amostras de fluido gengival coletadas de pacientes. Os autores observaram, através da análise proteômica das amostras, alterações na abundância de proteínas associadas não apenas à síntese de H_2O_2 e NO, mas também no recrutamento de neutrófilos. Também observaram que 21 dias após a 1ª sessão clareadora permanecia um aumento da percentagem de proteínas relacionadas com a regeneração do tecido no grupo que recebeu menor concentração de H_2O_2 , enquanto que permanecia um processo inflamatório exacerbado no grupo clareado com PH 35%.

Apesar das limitações dos modelos experimentais utilizados no presente estudo, como as características morfológicas dos dentes bovinos ou dos ratos serem distintas às do dente humano, os resultados mostraram que a redução da quantidade de material utilizado pode tornar o tratamento mais seguro e propiciar maior economia ao clínico dentro do consultório. Vale destacar que estudos futuros clínicos também devem ser realizados, considerando diferentes protocolos e posologias, objetivando a validação do estudo nos pacientes e verificação da ocorrência de menor sensibilidade pós-operatória.

De uma forma geral, os resultados obtidos no presente estudo sugerem que os efeitos adversos presentes nas terapias clareadoras são também volume-dependentes, tendo em vista que ocorreu maior difusão de H_2O_2 , maior imunomarcção de NO e infiltrado inflamatório severo, quando os maiores volumes foram utilizados. Por outro lado, a alteração do volume teve uma importância relativa na resposta clareadora, fazendo com que seja prudente haver uma

dosagem adequada dos produtos, sendo assim melhor ponderado os benefícios estéticos e os riscos biológicos envolvidos no procedimento.

5 CONCLUSÃO

A análise conjunta dos testes realizados nas condições experimentais descritas, permite-nos concluir que:

- O efeito clareador obtido na técnica clareadora *in office* não apresenta uma correlação direta com o volume de gel clareador aplicado sobre o esmalte;
- Os efeitos adversos relacionados à penetração de PH no tecido pulpar mostraram-se volume-dependentes.

REFERÊNCIAS

- 1 Almeida LCAG, Costa CAS, Riehl H, Santos PH, Sundfeld RH, Briso AL (2012) Occurrence of sensitivity during at-home and in-office tooth bleaching therapies with or without use of light sources. *Acta Odontol Latinoam* 25:3-8
- 2 Haywood VB, Heymann HO (1991) Nightguard vital bleaching: how safe is it? *Quintessence Int* 22:515-523
- 3 Francci C, Marson FC, Briso AL, Gomes MN (2010) Dental bleaching: current concepts and techniques. *Rev Assoc Paul Cir Dent* 64:78-89
- 4 Fonseca AS (org) (2014) *Odontologia estética: respostas às dúvidas mais frequentes*. Artes Médicas, São Paulo
- 5 Geus JL, Wambier LM, Kossatz S, Loguercio AD, Reis A (2016) At-home vs in-office bleaching: a systematic review and meta-analysis. *Oper Dent* 41:341-356. <https://doi.org/10.2341/15-287-LIT>
- 6 Machado LS, Oliveira FG, Rocha EP, Santos PH, Briso AL, Sundfeld ML, Sundfeld RH (2013) Clinical trial evaluating color change and tooth sensitivity throughout and following in-office bleaching. *Int J Periodontics Restorative Dent* 33:209-215. <https://doi.org/10.11607/prd.1410>
- 7 Araújo LS, Santos PH, Anchieta RB, Catelan S, Briso AL, Zaze AC, Sundfeld RH (2013) Mineral loss and color change of enamel after bleaching and staining solutions combination. *J Biomed Opt* 18:108004. <https://doi.org/10.1117/1.JBO.18.10.108004>
- 8 Briso AL, Fagundes TC, Gallinari MO, Moreira J, Almeida LCAG, Rahal V, Gonçalves RS, Santos PH (2016) An in situ study of the influence of staining beverages on color alteration of bleached teeth. *Oper Dent* 41:627-633. <https://doi.org/10.2341/15-306-L>
- 9 Machado AW (2014) 10 commandments of smile esthetics. *Dental Press J Orthod* 19:136-157. <https://doi.org/10.1590/2176-9451.19.4.136-157.sar>
- 10 Monteiro RV, Monteiro S Jr, Caldeira de Andrada MA (2018) Clinical evaluation of two in-office dental bleaching agents. *Am J Dent* 31:239-242
- 11 Lee DH, Lim BS, Lee YK, Yang HC (2006) Effects of hydrogen peroxide (H₂O₂) on alkaline phosphatase activity and matrix mineralization of odontoblast and osteoblast cell lines. *Cell Biol Toxicol* 22:39-46. <https://doi.org/10.1007/s10565-006-0018-z>
- 12 Silva LMAV, Cintra LTA, Gallinari MO, Benetti F, Rahal V, Ervolino E, Alcântara S, Briso ALF (2020) Influence of pain-relieving therapies on inflammation and the expression of

- proinflammatory neuropeptides after dental bleaching treatment. *Restor Dent Endod* 45:e20. <https://doi.org/10.5395/rde.2020.45.e20>
- 13 Caneppele TMF, Torres CRG, Bresciani E (2015) Analysis of the color and fluorescence alterations of enamel and dentin treated with hydrogen peroxide. *Braz Dent J* 26:514-518. <https://doi.org/10.1590/0103-6440201300249>
 - 14 Williams HA, Rueggeberg FA, Meiste RLW (1992) Bleaching the natural dentition to match the color of existing restorations: case reports. *Quintessence Int* 23:673-677
 - 15 Almeida LC, Soares DG, Gallinari MO, Souza Costa CA, Santos PH, Briso AL (2015) Color alteration, hydrogen peroxide diffusion, and cytotoxicity caused by in-office bleaching protocols. *Clin Oral Investig* 19:673-680. <https://doi.org/10.1007/s00784-014-1285-3>
 - 16 Perdigão J (2010) Dental whitening: revisiting the myths Northwest. *Northwest Dent* 89:19-26
 - 17 Li Y (1996) Biological properties of peroxide-containing tooth whiteners. *Food Chem Toxicol* 34:887-904. [https://doi.org/10.1016/s0278-6915\(96\)00044-0](https://doi.org/10.1016/s0278-6915(96)00044-0)
 - 18 Cintra LT, Benetti F, Ferreira LL, Rahal V, Ervolino E, Jacinto RC, Gomes Filho JE, Briso AL (2016) Evaluation of an experimental rat model for comparative studies of bleaching agents. *J Appl Oral Sci.* 24:95-104. <https://doi.org/10.1590/1678-775720150393>
 - 19 Benetti F, Briso ALF, Ferreira LL, Carminatti M, Álamo L, Ervolino E, Dezan-Júnior E, Cintra LTA (2018) In vivo study of the action of a topical anti-inflammatory drug in rat teeth submitted to dental bleaching. *Braz Dent J* 29:555-561. <https://doi.org/10.1590/0103-6440201802177>
 - 20 Dias Ribeiro AP, Sacono NT, Lessa FC, Nogueira I, Coldebella CR, Hebling J, Souza Costa CA (2009) Cytotoxic effect of a 35% hydrogen peroxide bleaching gel on odontoblast-like MDPC-23 cells. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 108:458-464. <https://doi.org/10.1016/j.tripleo.2009.05.006>
 - 21 Costa CA, Riehl H, Kina JF, Sacono NT, Hebling J (2010) Human pulp responses to in-office tooth bleaching. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 109:e59-e64. <https://doi.org/10.1016/j.tripleo.2009.12.002>
 - 22 Cintra LT, Benetti F, Silva Facundo AC, Ferreira LL, Gomes-Filho JE, Ervolino E, Rahal V, Briso AL (2013) The number of bleaching sessions influences pulp tissue damage in rat teeth. *J Endod* 39:1576-1580. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2013.08.007>
 - 23 Rahal V, Gallinari MO, Barbosa JS, Martins-Junior RL, Santos PH, Cintra LTA, Briso ALF (2018) Influence of skin cold sensation threshold in the occurrence of dental sensitivity

- during dental bleaching: a controlled clinical trial. *J Appl Oral Sci* 26:e20170043. <https://doi.org/10.1590/1678-7757-2017-0043>
- 24 Soares DG, Basso FG, Hebling J, Souza Costa CA (2014) Concentrations of and application protocols for hydrogen peroxide bleaching gels: effect on pulp cell viability and whitening efficacy. *J Dent* 42:185-198. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2013.10.021>
 - 25 Dusse LMS, Vieira LM, Carvalho MG (2003) Review on nitric oxide. *J Bras Patol Med Lab* 39:343-350. <https://doi.org/10.1590/S1676-24442003000400012>
 - 26 Maio FN, Lohinai Z, D'Arcangelo C, Fazio PE, Speranza L, Lutiis MA, Patruno A, Grilli A, Felaco M (2004) Nitric oxide synthase in healthy and inflamed human dental pulp. *J Dent Res* 83:312-316. <https://doi.org/10.1177/154405910408300408>
 - 27 Benetti F, Briso ALF, Carminatti M, Araújo Lopes JM, Barbosa JG, Ervolino E, Gomes-Filho JE, Cintra LTA (2019) The presence of osteocalcin, osteopontin and reactive oxygen species-positive cells in pulp tissue after dental bleaching. *Int Endod J* 52:665-675. <https://doi.org/10.1111/iej.13049>
 - 28 Marson FC, Gonçalves RS, Silva CO, Cintra LT, Pascotto RC, Santos PH, Briso AL (2015) Penetration of hydrogen peroxide and degradation rate of different bleaching products. *Oper Dent* 40:72-79. <https://doi.org/10.2341/13-270-L>
 - 29 Soares DG, Ribeiro AP, Silveira Vargas F, Hebling J, Souza Costa CA (2013) Efficacy and cytotoxicity of a bleaching gel after short application times on dental enamel. *Clin Oral Investig* 17:1901-1909. <https://doi.org/10.1007/s00784-012-0883-1>
 - 30 Al-Harbi A, Ardu S, Bortolotto T, Krejci I (2013) Effect of extended application time on the efficacy of an in-office hydrogen peroxide bleaching agent: an in vitro study. *Eur J Esthet Dent* 8:226-236
 - 31 Riehl H, Francci CE, Costa CAS, Ribeiro APD, Conceição EN (2008) Clareamento de dentes vitais e não vitais: uma visão crítica. In: Fonseca AS (org) *Odontologia estética: a arte da perfeição*. Artes Médicas, São Paulo, pp.499-565
 - 32 Oliveira Duque CC, Soares DG, Basso FG, Hebling J, Souza Costa CA (2017) Influence of enamel/dentin thickness on the toxic and esthetic effects of experimental in-office bleaching protocols. *Clin Oral Investig* 21:2509-2520. <https://doi.org/10.1007/s00784-017-2049-7>
 - 33 Lima AF, Fonseca FM, Cavalcanti AN, Aguiar FH, Marchi GM (2010) Effect of the diffusion of bleaching agents through enamel on dentin bonding at different depths. *Am J Dent* 23:113-115

- 34 Briso AL, Lima AP, Gonçalves RS, Gallinari MO, Dos Santos PH (2014) Transenamel and transdentinal penetration of hydrogen peroxide applied to cracked or microabrasioned enamel. *Oper Dent* 39:166-173. <https://doi.org/10.2341/13-014-L>
- 35 Gallinari MO, Fagundes TC, Silva LM, Almeida Souza MB, Barboza A, Briso A (2019) A new approach for dental bleaching using violet light with or without the use of whitening gel: study of bleaching effectiveness. *Oper Dent* 44:521-529. <https://doi.org/10.2341/17-257-L>
- 36 Cintra LT, Benetti F, Ferreira LL, Gomes-Filho JE, Ervolino E, Gallinari MO, Rahal V, Briso AL (2016) Penetration capacity, color alteration and biological response of two in-office bleaching protocols. *Braz Dent J* 27:169-175. <https://doi.org/10.1590/0103-6440201600329>
- 37 Perez MM, Ghinea R, Rivas MJ, Yebra A, Ionescu AM, Paravina RD, Herrera LJ (2016) Development of a customized whiteness index for dentistry based on CIELAB color space. *Dent Mater* 32:461-467. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2015.12.008>
- 38 Alkahtani R, Stone S, German M, Waterhouse P (2020) A review on dental whitening. *J Dent* 100:103423. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2020.103423>
- 39 Mottola HA, Simpson BE, Gorin G (1970) Absorptiometric determination of hydrogen peroxide in submicrogram amounts with leuco crystal violet and peroxidase as catalyst. *Anal Chem* 42:410-411. <https://doi.org/10.1021/ac60285a017>
- 40 Gallinari MO, Cintra LTA, Benetti F, Rahal V, Ervolino E, Briso ALF (2019) Pulp response of rats submitted to bleaching and the use of different anti-inflammatory drugs *PLoS One* 14:e0210338. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0210338>
- 41 Goldberg M, Grootveld M, Lynch E (2010) Undesirable and adverse effects of tooth-whitening products: a review. *Clin Oral Invest* 14:1-10. <https://doi.org/10.1007/s00784-009-0302-4>
- 42 Gerlach RW, Sagel PA (2004) Vital bleaching with a thin peroxide gel: the safety and efficacy of a professional-strength hydrogen peroxide whitening strip. *J Am Dent Assoc* 135:98-100. <https://doi.org/10.14219/jada.archive.2004.0028>
- 43 Charakorn P, Cabanilla LL, Wagner WC, Foong WC, Shaheen J, Pregitzer R, Schneider D (2009) The effect of preoperative ibuprofen on tooth sensitivity caused by in-office bleaching. *Oper Dent* 34:131-135. <https://doi.org/10.2341/08-33>
- 44 Vargas FDA S, Soares DG, Basso FG, Hebling J (2014) Dose-response and time-course α -tocopherol mediating the cytoprotection of dental pulp cells against hydrogen peroxide. *Braz Dent J* 25:367-371. <https://doi.org/10.1590/0103-6440201302434>

- 45 May LG, Salvia AC, Souza RO, Michida SM, Valera MC, Takahashi FE, Bottino MA (2010) Effect of sodium ascorbate and the time lapse before cementation after internal bleaching on bond strength between dentin and ceramic. *J Prosthodont* 19:374-380. <https://doi.org/10.1111/j.1532-849X.2010.00576.x>
- 46 Eimar H, Siciliano R, Abdallah MN, Nader SA, Amin WM, Martinez PP, Celemin A, Cerruti M, Tamimi F (2012) Hydrogen peroxide whitens teeth by oxidizing the organic structure. *J Dent* 40:e25-e33. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2012.08.008>
- 47 Briso ALF, Goncalves RS, Costa FB, Gallinari MO, Cintra LTA, Santos PH (2015) Demineralization and hydrogen peroxide penetration in teeth with incipient lesions. *Braz Dent J* 26:135-140. <https://doi.org/10.1590/0103-6440201300225>
- 48 Benetti F, Gomes-Filho JE, Ferreira LL, Ervolino E, Briso AL, Sivieri-Araújo G, Cintra LTA (2017) Hydrogen peroxide induces cell proliferation and apoptosis in pulp of rats after dental bleaching in vivo. *Arch Oral Biol* 81:103-109. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2017.04.013>
- 49 Benetti F, Gomes-Filho JE, Ferreira LL, Sivieri-Araujo G, Ervolino E, Briso ALF, Cintra LTA (2018) Concentration-dependent effect of bleaching agents on the immunolabeling of interleukin-6, interleukin-17, and CD5-positive cells in the dental pulp. *Int Endod J* 51:789-799. <https://doi.org/10.1111/iej.12891>
- 50 Benetti F, Briso ALF, Araújo Lopes JM, Carminatti M, Conti LC, Gallinari MO, Ervolino E, Cintra LTA (2019) In vivo analysis of the presence of heme oxygenase-1, transcription factor Jun-D and CD90+/CD73+/CD105+/CD45- cells in the pulp of bleached teeth. *Int Endod J* 52:1723-1737. <https://doi.org/10.1111/iej.13190>
- 51 Ishizuka Y, Yoshida M, Ambe K, Sasaki J, Sugihara N, Watanabe H (2019) Expression profiles of NOS isoforms in dental pulp and odontoblasts in nNOS knockout mice. *Bull Tokyo Dent Coll* 60:261-266. <https://doi.org/10.2209/tdcpublish.2019-0003>
- 52 An S (2020) Nitric oxide in dental pulp tissue: from molecular understanding to clinical application in regenerative endodontic procedures. *Tissue Eng Part B Rev* 26:327-347. <https://doi.org/10.1089/ten.teb.2019.0316>
- 53 Galler KM, Weber M, Korkmaz Y, Widbiller M, Feuerer M (2021) Inflammatory response mechanisms of the dentine-pulp complex and the periapical tissues. *Int J Mol Sci* 22:1480. <https://doi.org/10.3390/ijms22031480>
- 54 Colares VLP, Lima SNL, Sousa NCF, Araújo MC, Pereira DMS, Mendes SJF, Teixeira SA, Monteiro CA, Bandeca MC, Siqueira WL, Moffa EB, Muscará MN, Fernandes ES (2019) Hydrogen peroxide-based alter inflammatory and tissue damage-related proteins in the

gingival crevicular fluid of healthy volunteers: a randomized trial. Sci Rep 9:3457.
<https://doi.org/10.1038/s41598-019-40006-w>

ANEXO A - Certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais



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



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

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

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado **"Efeito do volume de gel clareador na alteração cromática, penetração trans-amelodentinária e no estresse oxidativo no tecido pulpar"**, Processo FOA nº 00547-2019, sob responsabilidade de André Luiz Fraga Briso apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 25 de Junho de 2019.

VALIDADE DESTE CERTIFICADO: 31 de Janeiro de 2021.

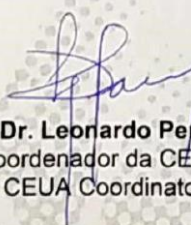
DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 04 de Março de 2021.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled **"Effect of bleaching gel volume on chromatic alteration, transenamel and transdentin penetration and oxidative stress on pulp tissue"**, Protocol FOA nº 00547-2019, under the supervision of André Luiz Fraga Briso presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on June 25, 2019.

VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: January 31, 2021.

DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: March 04, 2021.


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

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