



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

**Livia Maria Alves Valentim da Silva**

**Influência do LED Violeta associado ou não ao gel  
clareador na inflamação, mineralização e maturação  
colágena do tecido dentinário e pulpar**

Araçatuba - SP  
2021

**Livia Maria Alves Valentim da Silva**

**Influência do LED Violeta associado ou não ao gel  
clareador na inflamação, mineralização e maturação  
colágena do tecido dentinário e pulpar**

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

Orientador: Prof. Assoc. André Luiz Fraga Briso

Coorientador: Prof. Assoc. Luciano Tavares Angelo Cintra

Coorientadora: Prof. Dra. Francine Benetti

Araçatuba - SP  
2021

Catálogo na Publicação (CIP)  
Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

S586i Silva, Livia Maria Alves Valentim da.  
Influência do LED Violeta associado ou não ao gel clareador na inflamação, mineralização e maturação colágena do tecido dentinário e pulpar / Livia Maria Alves Valentim da Silva. - Araçatuba, 2021  
49 f. : il. ; tab.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia de Araçatuba  
Orientador: Prof. André Luiz Fraga Briso  
Coorientador: Prof. Luciano Tavares Angelo Cintra  
Coorientadora: Profa. Francine Benetti

1. Colágeno 2. Osteocalcina 3. Peróxido de hidrogênio  
I. T.

Black D2  
CDD 617.64

*À Deus, meus pais, hermanita, meu amor, Anívia, Lucas e  
Godofredo minha estrelinha.*

## *Agradecimentos*

Agradeço à **Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP**, pelo acolhimento, infraestrutura e oportunidade de crescimento. Me orgulho de todas as batalhas vividas, obstáculos superados e aprendizado conquistado.

Agradeço à **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)**, por me conceder três bolsas de Iniciação Científica durante a Graduação (Processo / renovação de bolsa nº 2015/21682-8, nos anos de 2016, 2017 e 2018) e pela bolsa de Mestrado durante a Pós-Graduação (Processo nº 2019/10474-6, de agosto de 2019 a fevereiro de 2021).

Agradeço à **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)**, pela bolsa de Mestrado no início da Pós-Graduação (Código de Financiamento 001, de março de 2019 a julho de 2019).

Ao meu Orientador **Prof. André Luiz Fraga Briso**, deixo aqui palavras que representam meu sentimento de gratidão. Gratidão pela oportunidade de vivenciar a pesquisa, amá-la e entendê-la, nos seus mínimos detalhes e particularidades (e confesso que até demais). Foram pouco mais de 5 anos convivendo juntos, e me lembro como se fosse ontem do nosso primeiro contato, no departamento, quando você me perguntou se eu era a nova aluna de “IC” e quando eu iria fazer um clareamento porque eu estava precisando. Eu gastaria muitas páginas descrevendo inúmeros momentos, desde as várias correções, estatísticas para descobrir a melhor forma de apresentar os resultados e repetições de etapas laboratoriais que no fim, desencadeavam minhas crises de herpes (Já tá com pereba? Parece que escuto você dizer...). Mas também, não posso me esquecer dos elogios e parabenizações, seja quando conseguia as renovações, durante as minhas apresentações, na execução dos trabalhos. Por fim, deixo aqui novamente meu agradecimento, e espero ter conseguido cumprir tudo que você estabeleceu para mim nessa jornada, porque serei eternamente grata por todo o cuidado, carinho e principalmente, o aprendizado que você me proporcionou durante todos estes anos.

Aos meus Coorientadores **Prof. Luciano Tavares Angelo Cintra e Francine Benetti**, agradeço imensamente por todo conhecimento compartilhado e sempre muito bem explicado, seja na interpretação das lâminas, aprender estatística ou até mesmo com conselhos e orientações. Tenho uma admiração muito grande pelo trabalho de vocês e os tenho como

exemplo. Obrigada por terem sido motivadores da minha paixão número “1” na pesquisa, a parte biológica ou o famoso estudo “*in vivo*”.

À **Marjorie de Oliveira Gallinari** meu muitíssimo obrigada, porque nunca escondi de ninguém que se não fosse por você eu não teria chegado até aqui e me tornado a pesquisadora que me tornei. Você dedicou seu tempo, seus dias, sua paciência e todo seu conhecimento comigo e só me resta agradecer. Me lembro que tudo começou aprendendo a cortar os dentes de boi, das idas no frigorífico, aprender a fazer leitura de cor no espectrofotômetro, limpar os ratos e clarear seus dentinhos, tirar fotos com a câmera profissional, etc etc etc. Lembro das noites e dos finais de semana fazendo penetração trans-amelodentinária de peróxido (lembra do dia que desligaram o computador e perdemos todos os dados?), e eu me orgulho tanto porque pude ensinar outras pessoas a fazer essa análise assim como você fez comigo e me ensinou. Obrigada, obrigada e obrigada Marjozita, que você alcance tudo que deseja nessa vida e como eu já te disse milhões de vezes, que eu consiga ser 1% do que você foi para mim para os meus futuros orientados.

Ao **Prof. Edilson Ervolino**, agradeço por todos ensinamentos desde à Graduação. Quando acompanhamos o laboratório de Dentística I confesso que tentei transmitir o que eu sabia para os alunos me inspirando no senhor, com calma, clareza e sempre acolhendo os alunos. Agradeço por me ensinar a realizar a análise imunoistoquímica e entendê-la, seja com os desenhos nas folhas ou com as explicações, mesmo tendo sido a parte mais complicada na execução da parte experimental, tendo em vista as mais de 200 lâminas perdidas na primeira tentativa (Rezou muito Livia? Só lembro do choro de alegria quando deu certo).

Ao **Prof. Paulo Henrique dos Santos**, deixo aqui meu agradecimento por ter contribuído tão grandemente para o meu aprendizado na Pós-Graduação.

Ao **Prof. Wirley Gonçalves Assunção**, eu agradeço por toda paciência desde os laboratórios e clínicas de prótese total (ainda guardo a minha dentadura até hoje professor) e por todo o carinho que sempre teve por mim. Te admiro muito e não deixo de te agradecer, porque apesar de não termos tido muito contato na Pós-Graduação, a admiração e inspiração que levo do senhor serão eternas.

À minha **mami, dady e hermanita**, minha razão de viver, de lutar e de superar qualquer obstáculo que surgir. O que seria de mim sem as várias chamadas de vídeo diárias? Agradeço por muitas vezes acreditarem mais em mim do que eu mesma, por me alegrarem, me distraírem nos momentos de incertezas e por me amarem. Amo vocês incondicionalmente e eternamente.

Ao meu namorado **Lucas Gabriel Alves Feitosa**, que estive ao meu lado nessa jornada de pesquisa desde a primeira iniciação científica, aguentando na maioria das vezes meus choros e desesperos, me apoiando, incentivando e sempre me fazendo lembrar que eu era (e sou) capaz, muito obrigada meu amor, eu te amo demais.

À **Sibele**, minha amiga, confidente, companheira, e irmã, não consigo expressar através de palavras o sentimento de agradecimento que carrego. Obrigada por aturar meu jeito muitas vezes falante demais e por sempre cair na risada quando eu te mandava fazer algo (Sibele faz isso, pega aquilo, escreve assim). Você esteve ao meu lado durante TODOS os momentos desde o início da Pós-Graduação e sei que o vínculo que criamos nada separará, você foi um presente divino e me orgulho da pesquisadora que se tornou.

À minha amiga **Mari Maria**, meu muitíssimo obrigada. Já te falei várias vezes que você foi sim minha primeira inspiração como professora durante o laboratório da Dentística I durante o seu Mestrado e no meu segundo ano da faculdade em 2014. Agradeço por me ouvir sempre que precisei, por ter a paciência de me ensinar estatística e por ser esse ser de luz. Tenho muito orgulho de você minha amiga, obrigada.

À minha **família, amigos, madrinha Rosilene e padrinho Zé Lauro** agradeço pelo apoio e elogios de sempre. Vocês são parte da minha história e este Título só prova que estar ao lado de quem realmente nos ama é o que mais importa para alcançarmos nossas metas e cumprir novos desafios.

*"Aqueles que nos amam nunca nos deixam de verdade".*  
*Sírius Black*

Silva LMAV. Influência do LED violeta associado ou não ao gel clareador na inflamação, mineralização e maturação colágena do tecido dentinário e pulpar [dissertação]. Araçatuba: Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista; 2021.

## RESUMO

**Objetivo:** Avaliar a influência do LED Violeta, associado ou não ao gel clareador a base de peróxido de hidrogênio (PH) a 17,5% no complexo dentino-pulpar de ratos. **Materiais e métodos:** Molares superiores de 80 ratos foram distribuídos nos grupos (n = 10): CONT – sem tratamento, PH – 1 aplicação de 30 minutos de PH a 17,5%, LED – 1 aplicação de 20 minutos do LED Violeta, e PH+LED - aplicação do PH e LED Violeta. Imediatamente (T0), e aos 7 (T1), 15 (T2) e 30 dias (T3) após o tratamento, os ratos foram eutanasiados e as maxilas processadas para avaliação histológica, imunoistoquímica (IL-17, IL-23 e osteocalcina), e de picrosírius red, sendo realizados os testes de Wilcoxon e Mann-Whitney e Teste-T pareado e Teste-T, respectivamente. ( $\alpha = 0,05$ ). **Resultados:** Necrose e infiltrado inflamatório severo foram observados nos grupos PH e PH+LED. Apenas o grupo PH+LED manteve a imunomarcção severa para IL-17 e IL-23, diferindo do grupo LED e PH que apresentaram moderada imunomarcção em T0. Os grupos PH e PH+LED apresentaram severa imunomarcção de OCN em T2 e moderada imunomarcção em T3. O grupo LED apresentou menor quantidade de fibras imaturas em T2 e T3 que o grupo CONT. **Conclusão:** A terapia com LED violeta não induziu inflamação e fibrose no tecido pulpar, apesar de acelerar a maturação das fibras de colágeno da dentina e, quando associada ao peróxido de hidrogênio, pode tornar os dentes mais sensíveis.

**Palavras-chave:** LED violeta. Colágeno. Citocinas pró-inflamatórias. Osteocalcina. Peróxido de hidrogênio.

Silva LMAV. Influence of violet LED associated or not with peroxide gel on inflammation, mineralization, and collagen fiber maturation in dentin and pulp tissue [dissertation]. Araçatuba: UNESP - São Paulo State University; 2021.

## **ABSTRACT**

**Objective:** Was to evaluated the influence of the Violet LED, associated or not with a 17.5% hydrogen peroxide (HP) bleaching gel in the dentin-pulp complex of rats. **Materials and methods:** Upper molars of eighty Wistar rats were distributed in the groups (n = 10): CONT - without treatment, HP - 1 application of 30 minutes of 17.5% HP, LED - 1 application of 20 minutes of the Violet LED, and HP+LED - application of HP and LED Violet. Immediately (T0), and at 7 (T1), 15 (T2) and 30 days (T3) after treatment, the rats were euthanized and the jaws were processed for histological, immunohistochemical evaluation (IL-17, IL-23 and osteocalcin), and picrosirius red, with Wilcoxon and Mann-Whitney tests and paired T-test and T-test, respectively ( $\alpha = 0.05$ ). **Results:** Necrosis and severe inflammatory infiltrate were observed in the PH and PH+LED groups. Only the PH+LED group maintained severe immunostaining for IL-17 and IL-23, differing from the LED and PH group which presented moderate T0 immunostaining. The PH and PH+LED groups presented severe immunostaining of OCN in T2 and moderate immunostaining in T3. The LED group had a lower amount of immature fibers in T2 and T3 than the CONT group. **Conclusion:** Violet LED therapy induced no inflammation and fibrosis in the pulp tissue, however accelerating the maturation of dentin collagen fibers and, when associated with hydrogen peroxide, can make the teeth more sensitive.

**Keywords:** Violet LED. Collagen. Proinflammatory cytokines. Osteocalcin. Hydrogen peroxide.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 Distribuição dos lotes e grupos experimentais de acordo com os tratamentos e tempos de análise. 17
- Figura 2 Imagens representativas do infiltrado inflamatório. Grupos CONT e LED com ausência de inflamação em todos os tempos; Grupos PH e PH + LED com áreas de necrose evidentes e infiltrado inflamatório severo imediatamente após o procedimento clareador; infiltrado inflamatório discreto em T1. [Coloração de Hematoxilina Eosina, 100×]. 23
- Figura 3 Imagens representativas da maturação das fibras colágenas dentinárias. Em T0 e T1 todos os grupos apresentaram maior quantidade de fibras maduras (coloração mais vermelho-amareladas). Em contrapartida, maior quantidade de fibras imaturas (amarelo-esverdeadas) foram observadas apenas nos grupos CONT e LED. Em T2 e T3, o grupo CONT apresentou maior quantidade de fibras imaturas que o grupo LED. 25
- Figura 4 Imagens representativas da maturação das fibras colágenas pulpares. As imagens em T0, T1, T2 e T3 representam os terços oclusal e médio dos grupos CONT, PH, LED E PH+LED e as imagens em T0-T3 representam o terço cervical dos grupos CONT, PH, LED E PH+LED em todos os tempos de análise. Maior quantidade de fibras maduras no grupo PH+LED em T0 no terço médio, além de maior quantidade de fibras imaturas em T1 nos terços oclusal e médio. Grupo LED apresentando mais fibras maduras e imaturas em T3. Maior quantidade de fibras maduras no terço cervical de todos os grupos experimentais. [Coloração de Picrosírius Red - 400×]. 28
- Figura 5 Imagens representativas da análise imunohistoquímica de IL-17 imediatamente (T0) e 7 dias (T1) após o clareamento nos terços oclusal e médio. Baixo padrão de imunomarcção nos terços oclusal e médio nos grupos CONT e LED em T0 e T1. Padrão severo de imunomarcção nos grupos PH e PH+LED em T0 no terço oclusal, sendo que apenas o grupo PH apresentou redução 32

da imunomarcção para moderada no terço médio. Grupo PH com moderado padrão de imunomarcção em T1, e grupo PH+LED com padrão severo no terço oclusal e moderado no terço médio em T1. [Análise imunoistoquímica de IL-17 - 1000×].

Figura 6      Imagens representativas da análise imunohistoquímica de IL-23      33  
7 dias (T1) após o clareamento nos terços oclusal e médio e 15 dias (T2) após o clareamento nos terços médio e cervical. Baixo padrão de imunomarcção nos terços oclusal, médio e cervical nos grupos CONT e LED em T1 e T2. Padrão moderado de imunomarcção nos grupos PH e PH+LED nos terços oclusal e médio em T1 e no terço médio em T2. Baixo padrão de imunomarcção nos grupos PH e PH+LED no terço cervical em T2. [Análise imunoistoquímica de IL-23 - 1000×].

Figura 7      Imagens representativas da análise imunohistoquímica de OCN      35  
15 dias (T2) após o clareamento. Baixo padrão de imunomarcção nos terços oclusal e médio no grupo CONT em T2. Padrão severo de imunomarcção nos terços oclusal e médio nos grupos PH, LED e PH+LED em T2. [Análise imunoistoquímica de Osteocalcina - 1000×].

## LISTA DE TABELAS

|          |                                                                                                                                                        |    |
|----------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1 | Mediana e valores de “p” atribuídos ao infiltrado inflamatório no tecido pulpar de acordo com o grupo experimental e os períodos de análise.           | 22 |
| Tabela 2 | Porcentagens de fibras colágenas dentinárias maduras e imaturas, de acordo com os grupos e tempos de análise.                                          | 24 |
| Tabela 3 | Porcentagens de fibras colágenas pulpares maduras e imaturas, de acordo com os grupos e tempos de análise.                                             | 27 |
| Tabela 4 | Mediana e valores de “p” atribuídos à marcação imunoistoquímica da IL-17 no tecido pulpar de acordo com o grupo experimental e os períodos de análise. | 30 |
| Tabela 5 | Mediana e valores de “p” atribuídos à marcação imunoistoquímica da IL-23 no tecido pulpar de acordo com o grupo experimental e os períodos de análise. | 31 |
| Tabela 6 | Mediana e valores de “p” atribuídos à marcação imunoistoquímica da OCN no tecido pulpar de acordo com o grupo experimental e os períodos de análise.   | 34 |

## SUMÁRIO

|   |                     |    |
|---|---------------------|----|
| 1 | INTRODUÇÃO          | 14 |
| 2 | MATERIAIS E MÉTODOS | 16 |
| 3 | RESULTADOS          | 21 |
| 4 | DISCUSSÃO           | 36 |
| 5 | CONCLUSÃO           | 39 |
|   | REFERÊNCIAS         | 40 |
|   | ANEXOS              | 46 |

## 1 INTRODUÇÃO\*

Um dos desafios da Odontologia estética está relacionado ao estabelecimento de terapias clareadoras cada vez mais eficazes e seguras<sup>1,2,3</sup>, frente a alta demanda ocorrida nos consultórios odontológicos.<sup>4</sup> Neste contexto, novos tratamentos que possam gerar mínima toxicidade e máxima eficácia sempre representam avanços importantes nesta área do conhecimento.

Recentemente, foi constatado em análises *in vitro* e observações clínicas que o emprego do LED violeta gerou benefícios ao tratamento[20-23], principalmente quando associado ao uso de peróxido de hidrogênio de concentrações inferiores a 17,5% [24,25]. Esta fonte portátil de luz emite luz no comprimento de onda entre 405 a 410 nm, coincidindo com o pico de absorção das moléculas cromóforas, fazendo com que a sua incidência no tecido dentário resulte em instabilidade e quebra destas moléculas, caracterizando um clareamento por um processo físico [20,24].

Entretanto, não há estudos que correlacionem seu mecanismo de ação com as possíveis alterações biológicas que poderiam ser provocadas nos tecidos dentários, e que, normalmente estão associadas à técnica clareadora *in office*, como a presença de danos pulpares e ocorrência de sensibilidade dentária [2-4].

Estudos mostram que as espécies reativas de oxigênio (ERO) liberadas durante o tratamento clareador utilizando géis à base de peróxido de hidrogênio [5,6], permeiam os tecidos dentários mineralizados provocando processo inflamatório no tecido pulpar [7], redução da taxa de respiração mitocondrial [8] e até a necrose parcial do tecido pulpar de humanos [9].

A partir dos danos oxidativos gerados pela presença das ERO, ocorre a liberação de citocinas pró-inflamatórias [10-12], como as interleucinas (IL)-17 e IL-6, já identificadas no tecido pulpar de molares de ratos após o clareamento dentário [10,11], além da IL-23 [13], ainda pouco estudada neste tecido [14]. Sabe-se que a IL-23 está relacionada à presença de IL-17 [15-17] e apresenta um papel importante em processos inflamatórios [18], como identificado anteriormente na periodontite [19]. Por esta razão, o estudo da presença de IL-17 e IL-23 pode oferecer dados dos efeitos de novas terapias que objetivam promover alteração cromática com ausência de sensibilidade.

---

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

A técnica clareadora baseada no emprego de altas concentrações de peróxido resulta na formação de dentina terciária, a qual é influenciada pelo aumento da presença de osteocalcina (OCN) [26,27]. Esta proteína envolvida na dentinogênese está presente nas células e na matriz extracelular do tecido pulpar, podendo ser associada à fibrose tecidual ou calcificação do tecido [26]. Além disso, os agentes clareadores também são capazes modificar as fibras colágenas da dentina e polpa [28,29], promover alterações estruturais e bioquímicas destes tecidos [30], acelerando o processo de maturação [31]. Entretanto, como o LED Violeta foi idealizado para atuar nos pigmentos orgânicos presentes na dentina [32], não se sabe se seus efeitos influenciariam também nas fibras colágenas dentinárias e pulpares, bem como na expressão de OCN no tecido pulpar.

Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos do LED Violeta, associado ou não a um gel clareador a base de PH a 17,5% no complexo dentinho-pulpar de ratos. As hipóteses nulas foram que o LED violeta associado ou não ao gel clareador: (1) não influenciaria na resposta inflamatória do tecido pulpar; (2) não influenciaria na expressão de citocinas pró-inflamatórias no tecido pulpar; (3) não influenciaria na imunomarcagem da OCN no tecido pulpar; (4) não influenciaria na maturação de fibras colágenas dentinárias e (5) não influenciaria na maturação de fibras colágenas pulpares.

## **2 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **Delineamento experimental**

O projeto apresentou para cada tempo analisado (T0 - imediatamente após a sessão clareadora; T1 - 7 dias após a sessão clareadora; T2 - 15 dias após a sessão clareadora; T3 - 30 dias após a sessão clareadora), um fator em estudo com 4 níveis: (CONT- sem tratamento; PH - tratamento com peróxido de hidrogênio a 17,5%; LED - irradiação com a luz LED Violeta e PH+LED - associação da luz com o gel clareador).

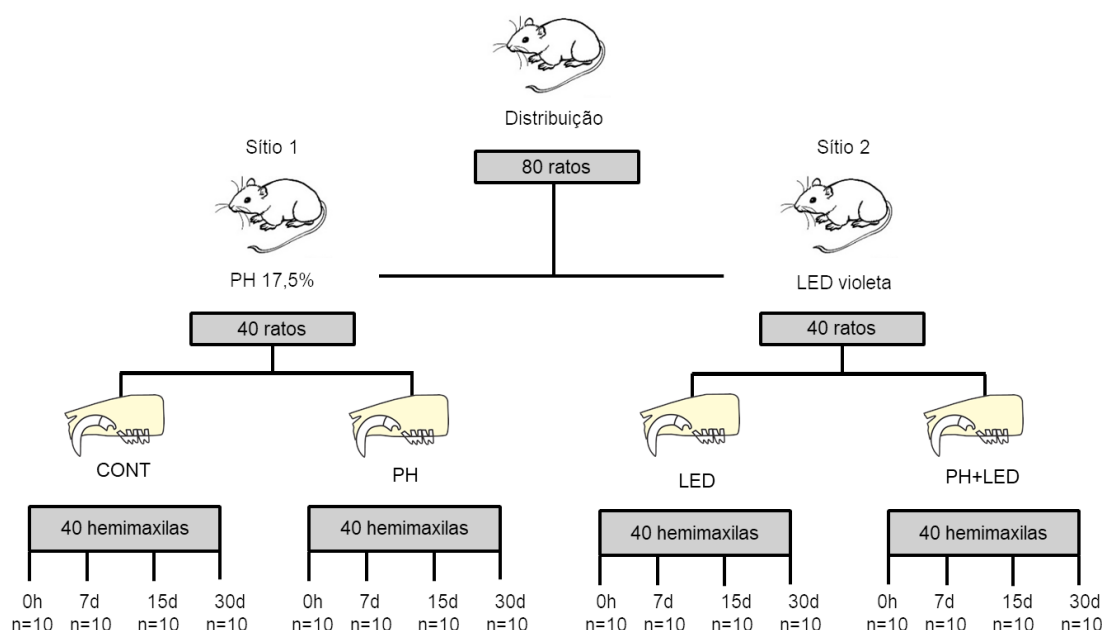
As variáveis de resposta consideradas foram: inflamação do tecido pulpar, expressão de citocinas pró-inflamatórias, expressão de osteocalcina e nível de maturação das fibras colágenas dentinárias e pulpares.

### **Animais**

Foram utilizados 80 ratos machos[10,33] (*Rattus albinus*, Wistar) de aproximadamente 250g, sendo mantidos em ambiente climatizado ( $22 \pm 1$  °C, umidade relativa de 70%), com ciclo de luz controlado (12 horas claro e 12 horas escuro), permanecendo 4 animais por gaiola. Os animais foram alimentados durante todo o período experimental com dieta sólida e água à vontade (Mogiana Alimentos SA, Campinas, Brazil). O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (Processo FOA nº 00420-2019) e conduzido de acordo com o guia para o cuidado e uso de animais de laboratório do National Institutes of Health (Bethesda, MD, USA).

### **Distribuição dos sítios experimentais**

Os animais foram inicialmente distribuídos em 2 sítios, correspondentes aos tratamentos realizados nas hemimaxilas direitas e/ou esquerdas, sendo os grupos experimentais divididos aleatoriamente de acordo com os tratamentos a serem realizados e tempos de análise, conforme apresentado no fluxograma a seguir (Fig 1).



**Fig. 1** Distribuição dos sítios e grupos experimentais de acordo com os tratamentos e tempos de análise.

### Procedimento clareador

Para a obtenção do gel clareador, manipulou-se o produto Whiteness HP Maxx (FGM Produtos Odontológicos, Joinville, SC, Brasil), na proporção de 3:3:2, sendo 3 gotas de PH, 3 gotas de água destilada e 2 gotas de espessante [8]. A mistura obtida resultou em gel a base de PH 17,5%, concentração determinada pelo método baseado na titulação do PH com permanganato de potássio, através de uma reação de oxido-redução [34].

Antes da realização do procedimento clareador, os animais foram anestesiados, via intramuscular, com uma associação do sedativo Cloridrato de Xilazina (10 mg/Kg, Syntec do Brasil LTDA, Cotia, São Paulo, Brasil) e Cloridrato de Quetamina (80 mg/Kg, União Química Farmacêutica Nacional S/A, Embu-Guaçu, São Paulo, Brasil) [26]. Em seguida, aplicou-se a barreira gengival fotopolimerizável (Top Dam - FGM Produtos Odontológicos Ltda., Santa Catarina, Brasil) ao redor de todos os molares superiores direito ou esquerdo, que receberam os tratamentos clareadores descritos a seguir.

Vale destacar que os animais pertencentes ao sítio 1 receberam os tratamentos Cont e PH, enquanto os do sítio 2 receberam os tratamentos LED e PH+LED. O tratamento realizado em cada hemiarcada foi determinado por sorteio.

Sítio 1- Grupo CONT - Os molares superiores pertencentes a uma das hemi-maxilas não receberam nenhum tipo de tratamento clareador.

Sítio 1- Grupo PH - Com o auxílio de uma pipeta para líquidos viscosos (Microman E M100E, Gilson, Inc, Middleton, Wisconsin, USA), foram aplicados sobre os molares superiores 4 µL do gel a base de peróxido de hidrogênio a 17,5%, permanecendo em contato com a estrutura dentária por 30 minutos [7]. Em seguida, os dentes foram limpos com algodão e papel absorvente e lavados abundantemente com água.

Sítio 2 – Grupo LED – A ponteira acrílica do aparelho de luz LED Violeta (Fotoclareador Bright Maxx Whitening, MMOptics Ltda., São Carlos, SP, Brasil), foi posicionada à 5 mm dos molares superiores, recebendo um ciclo de 20 minutos de irradiação. Este equipamento apresenta 4 leds violeta, que emitem luz com comprimento de onda de 405-410 nm e potência óptica máxima total de 1,2W.

Sítio 2 – Grupo PH+LED - Primeiramente, os molares superiores receberam a aplicação do produto a base de peróxido de hidrogênio a 17,5%, sendo irradiados da mesma forma descrita no grupo LED. Ao término da aplicação, os dentes foram limpos com algodão e papel absorvente, e lavados abundantemente com água.

Os animais foram eutanasiados imediatamente e aos 7, 15 e 30 dias decorridos do procedimento clareador, sendo realizada overdose do anestésico Tiopental (Thiopental, Cristália - Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda - Itapira, Brasil) [10].

### **Processamento das amostras**

As hemimaxilas foram removidas, dissecadas e fixadas em solução de formaldeído a 4% por 24 horas. Os espécimes foram descalcificados em solução desmineralizadora de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) a 10% (Sigma-Aldrich, MO, Estados Unidos) por aproximadamente 3 meses, e posteriormente desidratados, clarificados e incluídos em parafina.

A microtomia foi realizada no sentido vestibulo-lingual em micrótomo de deslizamento (Leica Microsystems - RM 2045, Wetzlar, Germany) resultando em cortes seriados com 5 µm de espessura, que foram selecionados a partir do ponto onde a raiz mesial do primeiro molar foi vista em toda sua extensão longitudinal, servindo de orientação durante a realização dos cortes da câmara pulpar.

As quatro primeiras lâminas obtidas foram coradas com hematoxilina-eosina (HE) [35] e pricosírius red (PSR) [36], e os próximos seis cortes foram submetidos à análise imunoistoquímica pela técnica da imunoperoxidase indireta [26] para IL-17, IL-23 e OCN.

Para as reações imunohistoquímicas, os cortes histológicos foram desparafinizados em xilol e hidratados em série decrescente de etanol. A recuperação antigênica foi realizada por meio da imersão das lâminas histológicas em solução tampão citrato (Antigen Retrieval Buffer; Spring Bioscience, Pleasanton, CA, EUA) em câmara pressurizada (Decloaking Chamber; Biocare Medical, Concord, CA, EUA) a 95°C por 10 minutos [26]. Entre cada uma das etapas da reação imunoistoquímica foram feitas lavagens em solução salina tamponada. Para o bloqueio da peroxidase endógena os cortes histológicos foram imersos em solução de peróxido de hidrogênio a 3% por 1 hora, e em 1% de soro albumina bovino para o bloqueio dos sítios inespecíficos por 12 horas [26].

Em seguida, as lâminas histológicas foram divididas em três lotes, recebendo um dos seguintes anticorpos-primários: anti-IL-17 (anticorpo de rato gerado em coelho, 1:100, SC 1265; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA); anti-IL-23 (anticorpo de rato gerado em coelho, 1:100, SC 7927; Santa Cruz Biotechnology) e anti-OCN (anticorpo de rato gerado em cabra SC-18319; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, EUA).

Os anticorpos primários foram diluídos em PBS acrescido de 0,1% Triton X-100 (PBS-TX), durante 24 horas, em câmara úmida. Nas etapas subsequentes foi utilizado o Universal Dako Labeled Streptavidin-Biotin Kit® (Dako Laboratories, CA, USA). Após lavagens, as secções foram incubadas no anticorpo secundário biotinilado, 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 contracorados com hematoxilina de Harris e protegidos com meio de montagem em bálsamo e lamínula de vidro [26]. Como controle negativo, os espécimes foram submetidos aos procedimentos descritos anteriormente suprimindo-se a utilização dos anticorpos primários.

### **Análise histológica e imunoistoquímica**

As análises foram realizadas por um único operador calibrado, de maneira cega, sob microscopia óptica (100×, DM 4000 B; Leica, Wetzlar, Alemanha).

A infiltrado inflamatório foi analisado nos terços da polpa dentária, como descrito anteriormente [4], obedecendo os escores: 1- células inflamatórias ausentes ou em número desprezível; 2- infiltrado inflamatório discreto (< 25 células por campo); 3- infiltrado inflamatório moderado (entre 25 e 125 células por campo); 4- infiltrado inflamatório severo (> 125 células por campo); e 5- necrose.

Os níveis de maturação das fibras colágenas dentinárias e dos terços correspondentes à polpa dentária foram analisados nos cortes corados por PSR sob microscopia de luz polarizada. Foi utilizado o programa QWin (magnificação 400×; Leica QWin V3, Leica Microsystems) obtendo a área correspondente às cores que indicam cada tipo de fibra de colágeno nos tecidos, sendo as fibras amarelo-esverdeadas consideradas imaturas e finas, enquanto as fibras vermelho-amareladas consideradas maduras e espessas [31].

A análise da imunomarcção para IL-17, IL-23 e OCN nos terços da polpa dentária foi definida avaliando-se a presença de coloração acastanhada no citoplasma das células e na matriz extracelular da polpa coronária, utilizando escores descritos anteriormente [10,11,26]: 0- ausência de imunomarcção; 1- baixo padrão de imunomarcção; 2- padrão moderado de imunomarcção; 3- padrão severo de imunomarcção.

### **Análise estatística**

O software Sigma Plot (Systat, San Jose, CA, USA) foi utilizado para realização da análise estatística. Para as comparações estatísticas da resposta inflamatória e imunomarcção de IL-17, IL-23 e OCN foram utilizados testes não-paramétricos de Wilcoxon para as análises pareadas (CONT×PH e LED×PH+LED) e Mann-Whitney para as análises não-pareadas (CONT×LED e PH×PH+LED). Testes paramétricos, Teste-T pareado Wilcoxon para as análises pareadas e Teste-T para as análises não-pareadas, foram utilizados para comparações estatísticas do nível de maturação das fibras colágenas dentinárias e pulpares, após realização do teste de normalidade. Os dados que não passaram na normalidade foram submetidos aos testes Wilcoxon e Mann-Whitney, respectivamente. Para todos os testes foi adotado o nível de significância de 5%.

### 3 RESULTADOS

#### *Análise do infiltrado inflamatório*

As imagens representativas do infiltrado inflamatório são mostradas na Fig 2 e os resultados na Tabela 1. Em T0 foi possível observar a presença de necrose no terço oclusal dos grupos PH e PH+LED ( $p = 0,651$ ), em contraste aos grupos CONT e LED, em que as células inflamatórias estavam ausentes ( $p = 1,000$ ). Nos terços médio e cervical, os grupos PH e PH+LED apresentaram infiltrado inflamatório severo ( $p > 0,05$ ), diferindo estatisticamente dos grupos CONT e LED, que apresentaram aspectos de normalidade do tecido pulpar e ausência de células inflamatórias ( $p = 1,000$ ).

Em T1, o terço oclusal dos grupos PH e PH+LED foram semelhantes ( $p = 0,734$ ) e apresentaram maior celularidade e infiltrado inflamatório discreto. No terço médio, enquanto o grupo LED apresentou aspecto de normalidade, as amostras do grupo PH+LED apresentaram infiltrado inflamatório discreto ( $p = 0,031$ ). No terço cervical, todos os grupos apresentaram ausência de células inflamatórias ( $p = 1,000$ ).

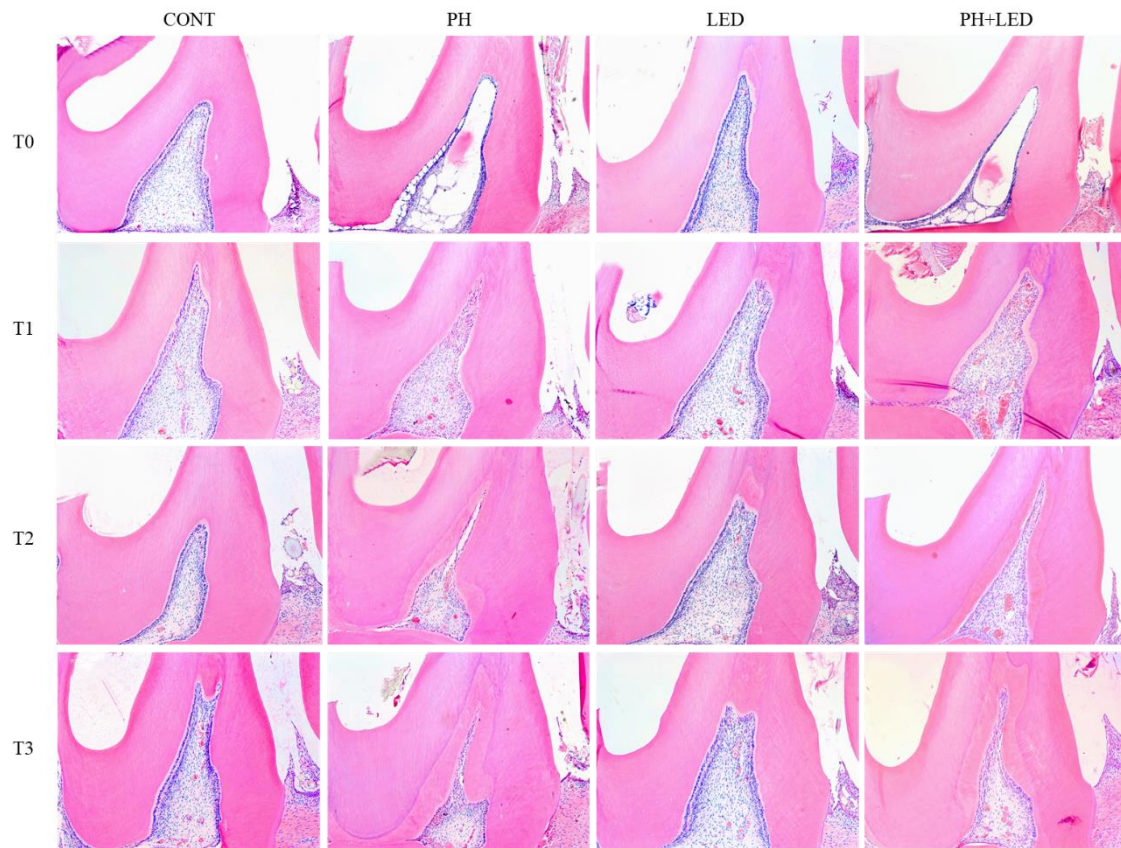
Em T2 e T3, todos os grupos apresentaram um tecido pulpar organizado e ausência de células inflamatórias ( $p > 0,05$ ).

**Tabela 1** Mediana e valores de “*p*” atribuídos ao infiltrado inflamatório no tecido pulpar de acordo com o grupo experimental e os períodos de análise.

|          |                | T0                  |    |     |        | T1                  |     |     |        | T2                 |    |     |        | T3                 |    |     |        |
|----------|----------------|---------------------|----|-----|--------|---------------------|-----|-----|--------|--------------------|----|-----|--------|--------------------|----|-----|--------|
|          |                | CONT                | PH | LED | PH+LED | CONT                | PH  | LED | PH+LED | CONT               | PH | LED | PH+LED | CONT               | PH | LED | PH+LED |
| Oclusal  | Mediana        | 1                   | 5  | 1   | 5      | 1                   | 2   | 1   | 2,5    | 1                  | 1  | 1   | 1      | 1                  | 1  | 1   | 1      |
|          | Valor <i>p</i> | *CONT×PH = 0,002    |    |     |        | *CONT×PH = 0,002    |     |     |        | CONT×PH = 0,125    |    |     |        | CONT×PH = 1,000    |    |     |        |
|          |                | *LED×PH+LED = 0,002 |    |     |        | *LED×PH+LED = 0,002 |     |     |        | LED×PH+LED = 0,500 |    |     |        | LED×PH+LED = 1,000 |    |     |        |
|          |                | CONT×LED = 1,000    |    |     |        | CONT×LED = 1,000    |     |     |        | CONT×LED = 1,000   |    |     |        | CONT×LED = 1,000   |    |     |        |
|          |                | PH×PH+LED = 0,651   |    |     |        | PH×PH+LED = 0,734   |     |     |        | PH×PH+LED = 0,322  |    |     |        | PH×PH+LED = 1,000  |    |     |        |
| Médio    | Mediana        | 1                   | 4  | 1   | 4      | 1                   | 1,5 | 1   | 2      | 1                  | 1  | 1   | 1      | 1                  | 1  | 1   | 1      |
|          | Valor <i>p</i> | *CONT×PH = 0,002    |    |     |        | CONT×PH = 0,063     |     |     |        | CONT×PH = 0,500    |    |     |        | CONT×PH = 1,000    |    |     |        |
|          |                | *LED×PH+LED = 0,002 |    |     |        | *LED×PH+LED = 0,031 |     |     |        | LED×PH+LED = 1,000 |    |     |        | LED×PH+LED = 1,000 |    |     |        |
|          |                | CONT×LED = 1,000    |    |     |        | CONT×LED = 1,000    |     |     |        | CONT×LED = 1,000   |    |     |        | CONT×LED = 1,000   |    |     |        |
|          |                | PH×PH+LED = 0,681   |    |     |        | PH×PH+LED = 0,551   |     |     |        | PH×PH+LED = 0,583  |    |     |        | PH×PH+LED = 1,000  |    |     |        |
| Cervical | Mediana        | 1                   | 4  | 1   | 4      | 1                   | 1   | 1   | 1      | 1                  | 1  | 1   | 1      | 1                  | 1  | 1   | 1      |
|          | Valor <i>p</i> | *CONT×PH = 0,002    |    |     |        | CONT×PH = 1,000     |     |     |        | CONT×PH = 1,000    |    |     |        | CONT×PH = 1,000    |    |     |        |
|          |                | *LED×PH+LED = 0,002 |    |     |        | LED×PH+LED = 1,000  |     |     |        | LED×PH+LED = 1,000 |    |     |        | LED×PH+LED = 1,000 |    |     |        |
|          |                | CONT×LED = 1,000    |    |     |        | CONT×LED = 1,000    |     |     |        | CONT×LED = 1,000   |    |     |        | CONT×LED = 1,000   |    |     |        |
|          |                | PH×PH+LED = 0,681   |    |     |        | PH×PH+LED = 1,000   |     |     |        | PH×PH+LED = 1,000  |    |     |        | PH×PH+LED = 1,000  |    |     |        |

CONT×PH e LED×PH+LED = Teste Wilcoxon ( $p < 0,05$ ); CONT×LED e PH×PH+LED = Teste Mann-Whitney ( $p < 0,05$ ). \*O asterisco

representa diferença estatisticamente significante entre os grupos.



**Fig. 2** Imagens representativas do infiltrado inflamatório. Grupos CONT e LED com ausência de inflamação em todos os tempos; Grupos PH e PH + LED com áreas de necrose evidentes e infiltrado inflamatório severo imediatamente após o procedimento clareador; infiltrado inflamatório discreto em T1. [Coloração de Hematoxilina Eosina, 100×].

#### *Maturação das fibras colágenas dentinárias e pulpares*

A Tabela 2 mostra a porcentagem de fibras colágenas dentinárias maduras e imaturas. Em T0 e T1, todos os grupos apresentaram resultados semelhantes, com proporções equivalentes de maturidade, com maior quantidade de fibras maduras ( $p > 0,05$ ). No entanto, em relação às fibras imaturas, os grupos que receberam a aplicação do gel clareador (PH e PH+LED) apresentaram menor quantidade fibras imaturas ( $p > 0,05$ ).

Em T2 e T3, os grupos PH e PH+LED apresentaram maior quantidade de fibras maduras ( $p > 0,05$ ). Em relação às fibras imaturas, os grupos PH e PH+LED apresentaram proporções equivalentes de imaturidade, com menor quantidade de fibras imaturas ( $p = 0,162$ ). Em contrapartida, o grupo LED apresentou menor quantidade de fibras imaturas quando comparado

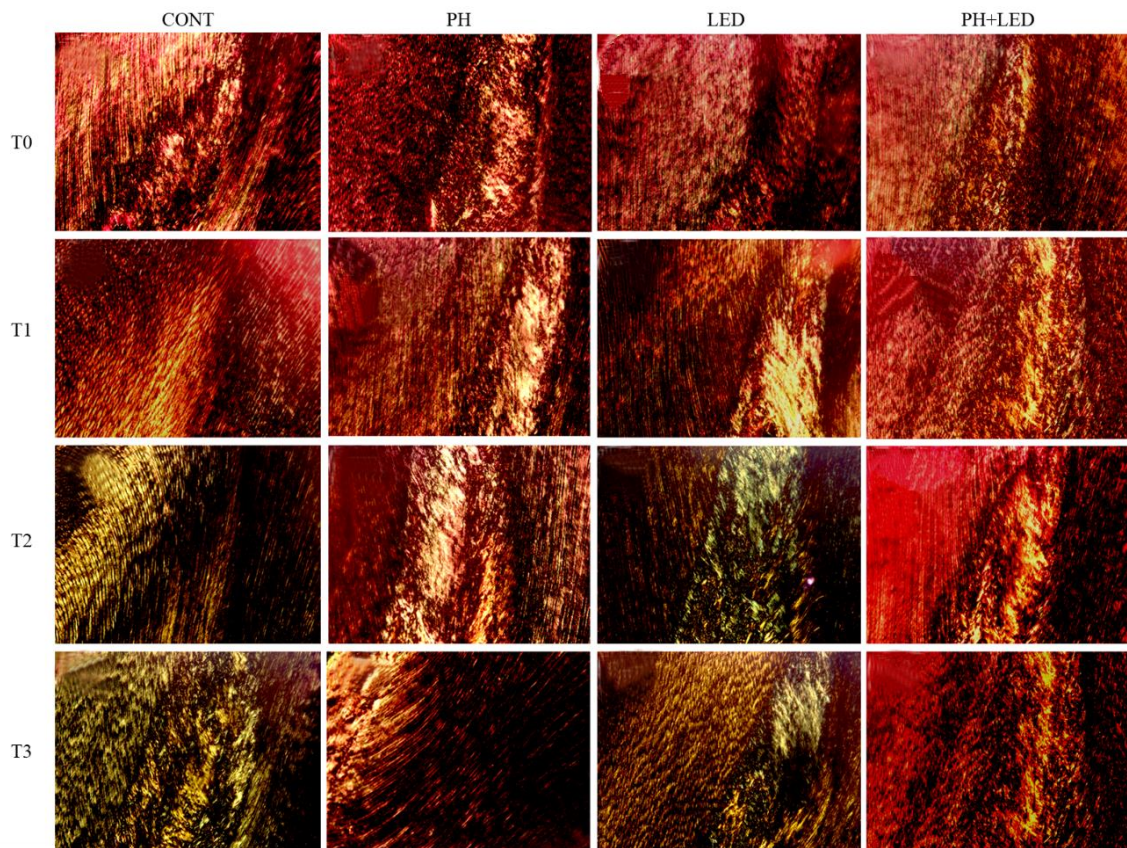
ao grupo CONT ( $p = 0,020$ ). Imagens representativas de cada grupo e tempo de análise estão apresentadas na Fig 3.

**Tabela 2** Porcentagens de fibras colágenas dentinárias maduras e imaturas, de acordo com os grupos e tempos de análise.

| (% $\pm$ DP) | T0                           |       |       |        | T1                            |       |       |        | T2                           |       |       |        | T3                           |       |       |        |
|--------------|------------------------------|-------|-------|--------|-------------------------------|-------|-------|--------|------------------------------|-------|-------|--------|------------------------------|-------|-------|--------|
|              | CONT                         | PH    | LED   | PH+LED | CONT                          | PH    | LED   | PH+LED | CONT                         | PH    | LED   | PH+LED | CONT                         | PH    | LED   | PH+LED |
| Madura       | 90,71                        | 83,41 | 92,01 | 83,43  | 87,50                         | 85,95 | 86,51 | 84,64  | 71,69                        | 84,91 | 73,35 | 81,00  | 64,97                        | 82,75 | 69,68 | 81,29  |
| $\pm$ DP     | 7,67                         | 7,52  | 7,77  | 7,34   | 7,59                          | 7,51  | 7,51  | 7,32   | 7,22                         | 7,55  | 7,29  | 8,07   | 8,72                         | 7,16  | 8,21  | 4,03   |
| Valor $p$    | CONT $\times$ PH = 0,166     |       |       |        | CONT $\times$ PH = 0,667      |       |       |        | *CONT $\times$ PH = 0,005    |       |       |        | *CONT $\times$ PH = 0,033    |       |       |        |
|              | °LED $\times$ PH+LED = 0,219 |       |       |        | LED $\times$ PH+LED = 0,683   |       |       |        | *LED $\times$ PH+LED = 0,027 |       |       |        | *LED $\times$ PH+LED = 0,014 |       |       |        |
|              | CONT $\times$ LED = 0,069    |       |       |        | CONT $\times$ LED = 0,810     |       |       |        | CONT $\times$ LED = 0,686    |       |       |        | CONT $\times$ LED = 0,433    |       |       |        |
|              | PH $\times$ PH+LED = 0,997   |       |       |        | PH $\times$ PH+LED = 0,777    |       |       |        | PH $\times$ PH+LED = 0,392   |       |       |        | PH $\times$ PH+LED = 0,599   |       |       |        |
| Imatura      | 9,98                         | 3,57  | 9,22  | 3,65   | 12,22                         | 3,21  | 12,35 | 3,13   | 24,97                        | 10,14 | 19,63 | 11,62  | 34,15                        | 12,98 | 24,71 | 11,63  |
| $\pm$ DP     | 2,35                         | 1,71  | 4,00  | 2,07   | 2,99                          | 0,62  | 2,86  | 1,03   | 3,05                         | 1,97  | 3,57  | 1,39   | 6,20                         | 2,22  | 4,15  | 3,28   |
| Valor $p$    | *CONT $\times$ PH = 0,002    |       |       |        | *CONT $\times$ PH = <0,001    |       |       |        | *CONT $\times$ PH = <0,001   |       |       |        | *CONT $\times$ PH = <0,001   |       |       |        |
|              | *LED $\times$ PH+LED = 0,036 |       |       |        | *LED $\times$ PH+LED = <0,001 |       |       |        | *LED $\times$ PH+LED = 0,001 |       |       |        | *LED $\times$ PH+LED = 0,002 |       |       |        |
|              | CONT $\times$ LED = 0,696    |       |       |        | CONT $\times$ LED = 0,943     |       |       |        | *CONT $\times$ LED = 0,020   |       |       |        | *CONT $\times$ LED = 0,013   |       |       |        |
|              | PH $\times$ PH+LED = 0,945   |       |       |        | PH $\times$ PH+LED = 0,882    |       |       |        | PH $\times$ PH+LED = 0,162   |       |       |        | PH $\times$ PH+LED = 0,423   |       |       |        |

CONT $\times$ PH e LED $\times$ PH+LED = Teste T pareado ( $p < 0,05$ ) ou °Teste Wilcoxon ( $p < 0,05$ ); CONT $\times$ LED e PH $\times$ PH+LED = Teste T ( $p < 0,05$ ).

Dados apresentados na forma de média da % e desvio padrão (DP). \*O símbolo destaca a diferença significativa entre os grupos.



**Fig. 3** Imagens representativas da maturação das fibras colágenas dentinárias. Em T0 e T1 todos os grupos apresentaram maior quantidade de fibras maduras (coloração mais vermelho-amareladas). Em contrapartida, maior quantidade de fibras imaturas (amarelo-esverdeadas) foram observadas apenas nos grupos CONT e LED. Em T2 e T3, o grupo CONT apresentou maior quantidade de fibras imaturas que o grupo LED. [Coloração de Pricosírius Red - 400×].

Já no tecido pulpar, a Tabela 3 mostra que no terço oclusal, todos os grupos apresentaram maior quantidade de fibras maduras e menor de fibras imaturas em T0, sendo todos os grupos semelhantes entre si ( $p > 0,05$ ). No terço médio, o grupo PH+LED apresentou maior quantidade de fibras maduras quando comparado ao grupo PH, que apresentou menores valores ( $p = 0,002$ ). Já em relação às fibras imaturas, todos os grupos foram semelhantes ( $p > 0,05$ ).

Em T1, nos terços oclusal e médio, todos os grupos apresentaram a mesma proporcionalidade de fibras maduras ( $p > 0,05$ ). Já o grupo PH apresentou maior quantidade de fibras imaturas quando comparado ao grupo PH+LED ( $p < 0,05$ ), sendo todas as outras comparações semelhantes.

Em T2, todos os grupos apresentaram nos terços oclusal e médio mais fibras maduras e menos fibras imaturas ( $p > 0,05$ ), e em T3, o grupo LED apresentou maior quantidade de fibras maduras no terço oclusal, diferindo estatisticamente do grupo PH+LED ( $p = 0,008$ ). Apenas o grupo PH+LED apresentou mais fibras imaturas em relação ao grupo LED no terço médio ( $p = 0,049$ ).

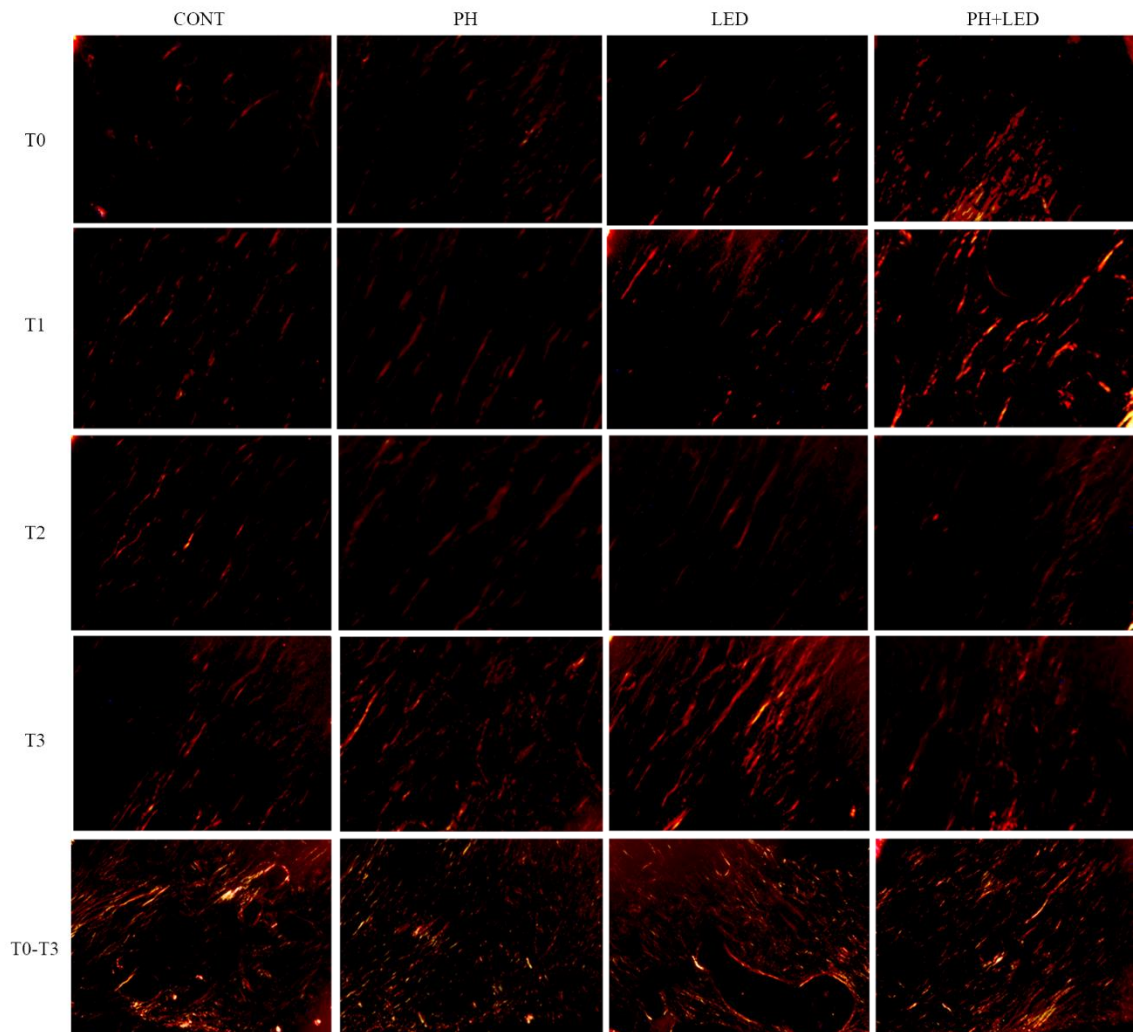
No terço cervical, todos os grupos apresentaram aumento na quantidade de fibras maduras, sendo todos semelhantes entre si ( $p > 0,05$ ) (Fig 4).

**Tabela 3** Porcentagens de fibras colágenas pulpares maduras e imaturas, de acordo com os grupos e tempos de análise.

|          |                | T0                  |       |       |        | T1                  |       |       |        | T2                 |       |       |        | T3                  |       |       |        |
|----------|----------------|---------------------|-------|-------|--------|---------------------|-------|-------|--------|--------------------|-------|-------|--------|---------------------|-------|-------|--------|
| (% ± DP) |                | CONT                | PH    | LED   | PH+LED | CONT                | PH    | LED   | PH+LED | CONT               | PH    | LED   | PH+LED | CONT                | PH    | LED   | PH+LED |
| Occlusal | Madura         | 9,35                | 12,34 | 13,64 | 11,65  | 10,62               | 9,96  | 19,99 | 15,32  | 15,68              | 7,29  | 11,96 | 5,13   | 12,17               | 7,05  | 15,25 | 6,12   |
|          | ± DP           | 3,99                | 4,09  | 4,24  | 4,37   | 4,56                | 4,78  | 5,01  | 4,29   | 4,19               | 3,81  | 4,07  | 4,36   | 4,32                | 5,02  | 6,46  | 2,92   |
|          |                | CONT×PH = 0,187     |       |       |        | CONT×PH = 0,858     |       |       |        | CONT×PH = 0,082    |       |       |        | °CONT×PH = 0,250    |       |       |        |
|          | Valor <i>p</i> | °LED×PH+LED = 0,813 |       |       |        | LED×PH+LED = 0,112  |       |       |        | LED×PH+LED = 0,081 |       |       |        | *LED×PH+LED = 0,008 |       |       |        |
|          |                | CONT×LED = 0,194    |       |       |        | CONT×LED = 0,081    |       |       |        | CONT×LED = 0,297   |       |       |        | CONT×LED = 0,348    |       |       |        |
|          |                | PH×PH+LED = 0,786   |       |       |        | PH×PH+LED = 0,066   |       |       |        | °PH×PH+LED = 0,052 |       |       |        | PH×PH+LED = 0,791   |       |       |        |
|          | Imatura        | 0,01                | 0,03  | 0,02  | 0,03   | 0,01                | 0,02  | 0,05  | 0,54   | 0,05               | 1,27  | 0,05  | 0,01   | 0,02                | 0,03  | 0,03  | 0,06   |
|          | ± DP           | 0,03                | 0,04  | 0,02  | 0,02   | 0,02                | 0,02  | 0,05  | 0,55   | 0,06               | 2,83  | 0,05  | 0,02   | 0,03                | 0,01  | 0,02  | 0,05   |
|          |                | CONT×PH = 0,093     |       |       |        | CONT×PH = 0,252     |       |       |        | °CONT×PH = 1,000   |       |       |        | °CONT×PH = 0,875    |       |       |        |
|          | Valor <i>p</i> | LED×PH+LED = 0,430  |       |       |        | LED×PH+LED = 0,109  |       |       |        | LED×PH+LED = 0,143 |       |       |        | LED×PH+LED = 0,277  |       |       |        |
|          |                | CONT×LED = 0,537    |       |       |        | °CONT×LED = 0,160   |       |       |        | CONT×LED = 0,910   |       |       |        | CONT×LED = 0,818    |       |       |        |
|          |                | °PH×PH+LED = 0,485  |       |       |        | *°PH×PH+LED = 0,010 |       |       |        | °PH×PH+LED = 0,792 |       |       |        | PH×PH+LED = 0,205   |       |       |        |
| Médio    | Madura         | 5,45                | 10,18 | 9,82  | 15,05  | 7,66                | 11,76 | 18,20 | 17,48  | 3,61               | 6,85  | 6,23  | 7,09   | 5,20                | 10,58 | 13,82 | 5,15   |
|          | ± DP           | 4,55                | 4,57  | 4,74  | 4,93   | 4,89                | 5,09  | 5,32  | 4,60   | 3,32               | 3,20  | 3,48  | 3,76   | 4,27                | 4,38  | 6,13  | 3,77   |
|          | Valor <i>p</i> | °CONT×PH = 0,438    |       |       |        | CONT×PH = 0,725     |       |       |        | CONT×PH = 0,267    |       |       |        | CONT×PH = 0,598     |       |       |        |
|          |                | LED×PH+LED = 0,194  |       |       |        | LED×PH+LED = 0,768  |       |       |        | LED×PH+LED = 0,672 |       |       |        | LED×PH+LED = 0,144  |       |       |        |
|          |                | CONT×LED = 0,310    |       |       |        | °CONT×LED = 0,095   |       |       |        | CONT×LED = 0,297   |       |       |        | CONT×LED = 0,083    |       |       |        |
|          |                | *°PH×PH+LED = 0,002 |       |       |        | PH×PH+LED = 0,078   |       |       |        | PH×PH+LED = 0,841  |       |       |        | PH×PH+LED = 0,373   |       |       |        |
|          | Imatura        | 0,01                | 0,02  | 0,01  | 0,01   | 0,01                | 0,02  | 0,02  | 0,65   | 0,01               | 1,29  | 0,27  | 0,19   | 0,01                | 0,01  | 0,01  | 0,04   |
|          | ± DP           | 0,01                | 0,03  | 0,01  | 0,01   | 0,02                | 0,01  | 0,02  | 0,81   | 0,01               | 2,85  | 0,38  | 0,22   | 0,02                | 0,01  | 0,02  | 0,03   |
|          | Valor <i>p</i> | CONT×PH = 0,274     |       |       |        | CONT×PH = 0,215     |       |       |        | °CONT×PH = 0,500   |       |       |        | CONT×PH = 0,604     |       |       |        |
|          |                | °LED×PH+LED = 1,000 |       |       |        | LED×PH+LED = 0,136  |       |       |        | LED×PH+LED = 0,323 |       |       |        | *LED×PH+LED = 0,049 |       |       |        |
|          |                | °CONT×LED = 0,931   |       |       |        | °CONT×LED = 0,421   |       |       |        | °CONT×LED = 0,222  |       |       |        | °CONT×LED = 1,000   |       |       |        |
|          |                | °PH×PH+LED = 0,818  |       |       |        | *°PH×PH+LED = 0,010 |       |       |        | PH×PH+LED = 0,662  |       |       |        | PH×PH+LED = 0,259   |       |       |        |
| Cervical | Madura         | 56,68               | 62,37 | 61,19 | 63,73  | 66,63               | 58,10 | 84,81 | 76,72  | 45,07              | 34,85 | 61,22 | 62,90  | 45,51               | 39,86 | 53,44 | 35,16  |
|          | ± DP           | 14,02               | 14,51 | 14,97 | 15,52  | 16,02               | 16,39 | 17,22 | 14,20  | 10,96              | 11,80 | 11,37 | 11,03  | 7,87                | 9,49  | 12,93 | 21,36  |
|          |                | CONT×PH = 0,673     |       |       |        | CONT×PH = 0,863     |       |       |        | *CONT×PH = 0,031   |       |       |        | CONT×PH = 0,489     |       |       |        |
|          | Valor <i>p</i> | LED×PH+LED = 0,746  |       |       |        | LED×PH+LED = 0,339  |       |       |        | LED×PH+LED = 0,896 |       |       |        | LED×PH+LED = 0,300  |       |       |        |
|          |                | CONT×LED = 0,650    |       |       |        | CONT×LED = 0,104    |       |       |        | CONT×LED = 0,082   |       |       |        | CONT×LED = 0,351    |       |       |        |
|          |                | PH×PH+LED = 0,896   |       |       |        | PH×PH+LED = 0,198   |       |       |        | PH×PH+LED = 0,156  |       |       |        | PH×PH+LED = 0,728   |       |       |        |
|          | Imatura        | 0,25                | 0,27  | 0,35  | 0,53   | 0,32                | 0,11  | 0,37  | 1,26   | 0,74               | 0,10  | 0,45  | 0,57   | 1,29                | 0,31  | 0,79  | 1,21   |
|          | ± DP           | 0,20                | 0,26  | 0,25  | 0,50   | 0,31                | 0,05  | 0,38  | 2,02   | 0,59               | 0,10  | 0,31  | 0,36   | 1,06                | 0,40  | 0,29  | 2,04   |
|          |                |                     |       |       |        |                     |       |       |        |                    |       |       |        |                     |       |       |        |
|          |                |                     |       |       |        |                     |       |       |        |                    |       |       |        |                     |       |       |        |
|          |                |                     |       |       |        |                     |       |       |        |                    |       |       |        |                     |       |       |        |
|          |                |                     |       |       |        |                     |       |       |        |                    |       |       |        |                     |       |       |        |

|                |                    |                     |                    |                     |
|----------------|--------------------|---------------------|--------------------|---------------------|
| Valor <i>p</i> | CONT×PH = 0,889    | CONT×PH = 0,300     | °CONT×PH = 0,125   | °CONT×PH = 0,125    |
|                | LED×PH+LED = 0,365 | °LED×PH+LED = 0,313 | LED×PH+LED = 0,525 | °LED×PH+LED = 0,625 |
|                | CONT×LED = 0,507   | °CONT×LED = 1,000   | °CONT×LED = 0,421  | CONT×LED = 0,841    |
|                | PH×PH+LED = 0,294  | *°PH×PH+LED = 0,038 | *PH×PH+LED = 0,021 | PH×PH+LED = 0,352   |

CONT×PH and LED×PH+LED = Teste T pareado ( $p < 0,05$ ) ou °Teste Wilcoxon ( $p < 0,05$ ); PH×PH+LED = Teste T ( $p < 0,05$ ) ou °Teste Mann-Whitney ( $p < 0,05$ ). Dados apresentados na forma de média e desvio padrão (DP). \*O símbolo destaca a diferença significativa entre os grupos.



**Fig. 4** Imagens representativas da maturação das fibras colágenas pulpares. As imagens em T0, T1, T2 e T3 representam os terços oclusal e médio dos grupos CONT, PH, LED E PH+LED e as imagens em T0-T3 representam o terço cervical dos grupos CONT, PH, LED E PH+LED em todos os tempos de análise. Maior quantidade de fibras maduras no grupo PH+LED em T0 no terço médio, além de maior quantidade de fibras imaturas em T1 nos terços oclusal e médio. Grupo LED apresentando mais fibras maduras e imaturas em T3. Maior quantidade de fibras maduras no terço cervical de todos os grupos experimentais. [Coloração de Picrosírius Red - 400×].

### *Análise das citocinas pró-inflamatórias*

As imagens representativas da marcação imunológica para IL-17 e IL-23 estão apresentados nas Tabelas 4 e 5, respectivamente. Em T0, os grupos que receberam a aplicação do gel clareador (PH e PH+LED) foram semelhantes entre si e apresentaram severa imunomarcação para IL-17 e IL-23 no terço oclusal ( $p = 1,000$ ), diferindo respectivamente de CONT e LED, que também foram semelhantes entre si, mas com baixo padrão de imunomarcação ( $p < 0,002$ ). No terço médio, os grupos CONT e LED apresentaram baixo padrão de imunomarcação, sendo semelhantes entre si ( $p = 1,000$ ). Apenas o grupo PH+LED manteve a imunomarcação severa para IL-17 e IL-23, diferindo do grupo LED ( $p = 0,002$ ) e PH ( $p = 0,010$ ), que apresentaram moderada imunomarcação. Já no terço cervical, ambos os grupos clareados (PH e PH+LED) apresentaram imunomarcação moderada de IL-17 e IL-23 ( $p = 1,000$ ), diferindo dos grupos CONT e LED, respectivamente ( $p = 0,002$ ).

Em T1, os grupos que receberam a aplicação do gel clareador (PH e PH+LED) não apresentaram diferença entre si em todos os terços analisados ( $p > 0,05$ ). Entretanto, no terço oclusal, o grupo PH+LED apresentou severa imunomarcação de IL-17, enquanto houve padrão moderado para IL-23. No terço cervical todos os grupos apresentaram baixo padrão de imunomarcação ( $p = 1,000$ ).

Em T2, os grupos PH e PH+LED foram semelhantes e apresentaram moderada imunomarcação para ambas interleucinas no terço oclusal. Nesta região, os grupos LED e CONT foram semelhantes e apresentaram baixa marcação. O baixo padrão de imunomarcação também foi observado em todos os grupos e regiões em T3 ( $p > 0,05$ ).

**Tabela 4** Mediana e valores de “*p*” atribuídos à marcação imunoistoquímica da IL-17 no tecido pulpar de acordo com o grupo experimental e os períodos de análise.

|          |                | T0                  |    |     |        | T1                  |    |     |        | T2                  |    |     |        | T3                 |    |     |        |
|----------|----------------|---------------------|----|-----|--------|---------------------|----|-----|--------|---------------------|----|-----|--------|--------------------|----|-----|--------|
|          |                | CONT                | PH | LED | PH+LED | CONT                | PH | LED | PH+LED | CONT                | PH | LED | PH+LED | CONT               | PH | LED | PH+LED |
| Odusal   | Mediana        | 1                   | 3  | 1   | 3      | 1                   | 2  | 1   | 3      | 1                   | 2  | 1   | 2      | 1                  | 1  | 1   | 1      |
|          |                | *CONT×PH = 0,002    |    |     |        | *CONT×PH = 0,002    |    |     |        | *CONT×PH = 0,031    |    |     |        | CONT×PH = 1,000    |    |     |        |
|          |                | *LED×PH+LED = 0,002 |    |     |        | *LED×PH+LED = 0,002 |    |     |        | *LED×PH+LED = 0,008 |    |     |        | LED×PH+LED = 1,000 |    |     |        |
|          | Valor <i>p</i> | CONT×LED = 1,000    |    |     |        | CONT×LED = 1,000    |    |     |        | CONT×LED = 1,000    |    |     |        | CONT×LED = 1,000   |    |     |        |
|          |                | PH×PH+LED = 1,000   |    |     |        | PH×PH+LED = 0,408   |    |     |        | PH×PH+LED = 0,366   |    |     |        | PH×PH+LED = 1,000  |    |     |        |
| Médio    | Mediana        | 1                   | 2  | 1   | 3      | 1                   | 2  | 1   | 2      | 1                   | 1  | 1   | 1      | 1                  | 1  | 1   | 1      |
|          |                | *CONT×PH = 0,002    |    |     |        | *CONT×PH = 0,002    |    |     |        | CONT×PH = 0,500     |    |     |        | CONT×PH = 1,000    |    |     |        |
|          |                | *LED×PH+LED = 0,002 |    |     |        | *LED×PH+LED = 0,002 |    |     |        | LED×PH+LED = 0,500  |    |     |        | LED×PH+LED = 1,000 |    |     |        |
|          | Valor <i>p</i> | CONT×LED = 1,000    |    |     |        | CONT×LED = 1,000    |    |     |        | CONT×LED = 1,000    |    |     |        | CONT×LED = 1,000   |    |     |        |
|          |                | *PH×PH+LED = 0,010  |    |     |        | PH×PH+LED = 1,000   |    |     |        | PH×PH+LED = 1,000   |    |     |        | PH×PH+LED = 1,000  |    |     |        |
| Cervical | Mediana        | 1                   | 2  | 1   | 2      | 1                   | 1  | 1   | 1      | 1                   | 1  | 1   | 1      | 1                  | 1  | 1   | 1      |
|          |                | *CONT×PH = 0,002    |    |     |        | CONT×PH = 1,000     |    |     |        | CONT×PH = 1,000     |    |     |        | CONT×PH = 1,000    |    |     |        |
|          |                | *LED×PH+LED = 0,002 |    |     |        | LED×PH+LED = 1,000  |    |     |        | LED×PH+LED = 1,000  |    |     |        | LED×PH+LED = 1,000 |    |     |        |
|          | Valor <i>p</i> | CONT×LED = 1,000    |    |     |        | CONT×LED = 1,000    |    |     |        | CONT×LED = 1,000    |    |     |        | CONT×LED = 1,000   |    |     |        |
|          |                | PH×PH+LED = 1,000   |    |     |        | PH×PH+LED = 1,000   |    |     |        | PH×PH+LED = 1,000   |    |     |        | PH×PH+LED = 1,000  |    |     |        |

CONT×PH e LED×PH+LED = Teste Wilcoxon ( $p < 0,05$ ); PH×PH+LED = Teste Mann-Whitney ( $p < 0,05$ ). \*O asterisco representa

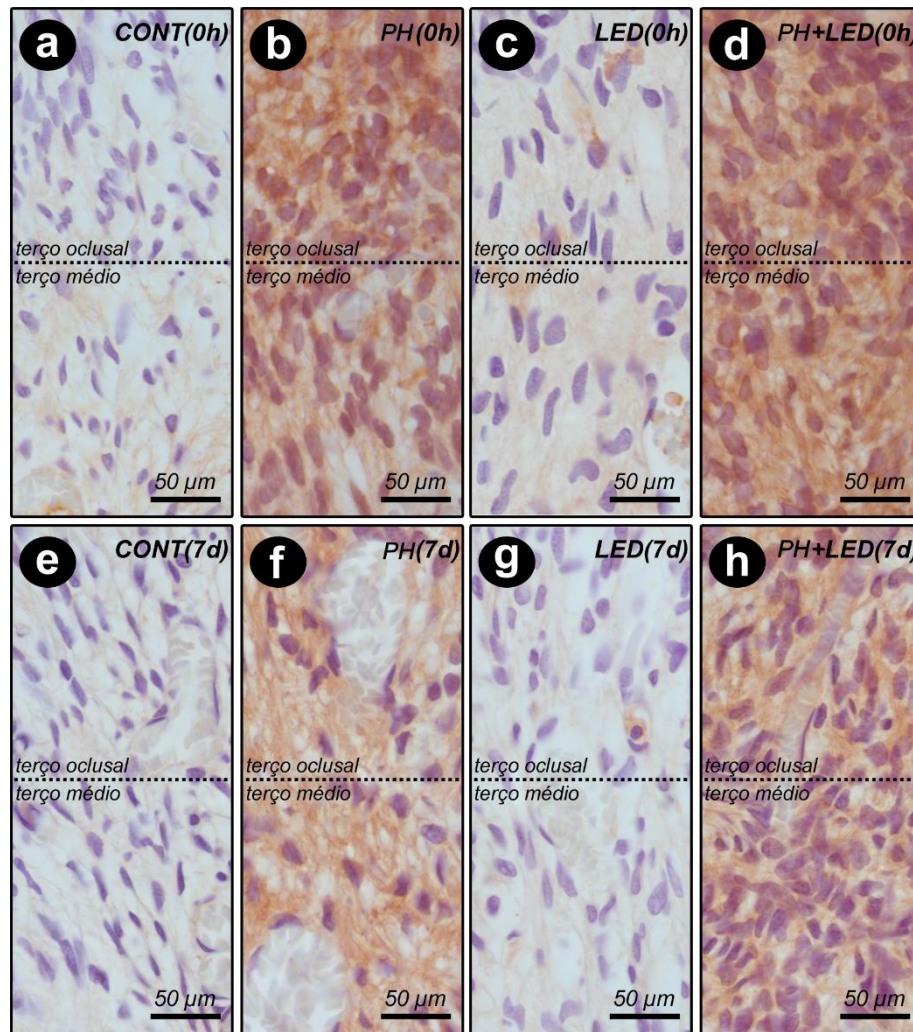
diferença estatisticamente significante entre os grupos.

**Tabela 5** Mediana e valores de “*p*” atribuídos à marcação imunoistoquímica da IL-23 no tecido pulpar de acordo com o grupo experimental e os períodos de análise.

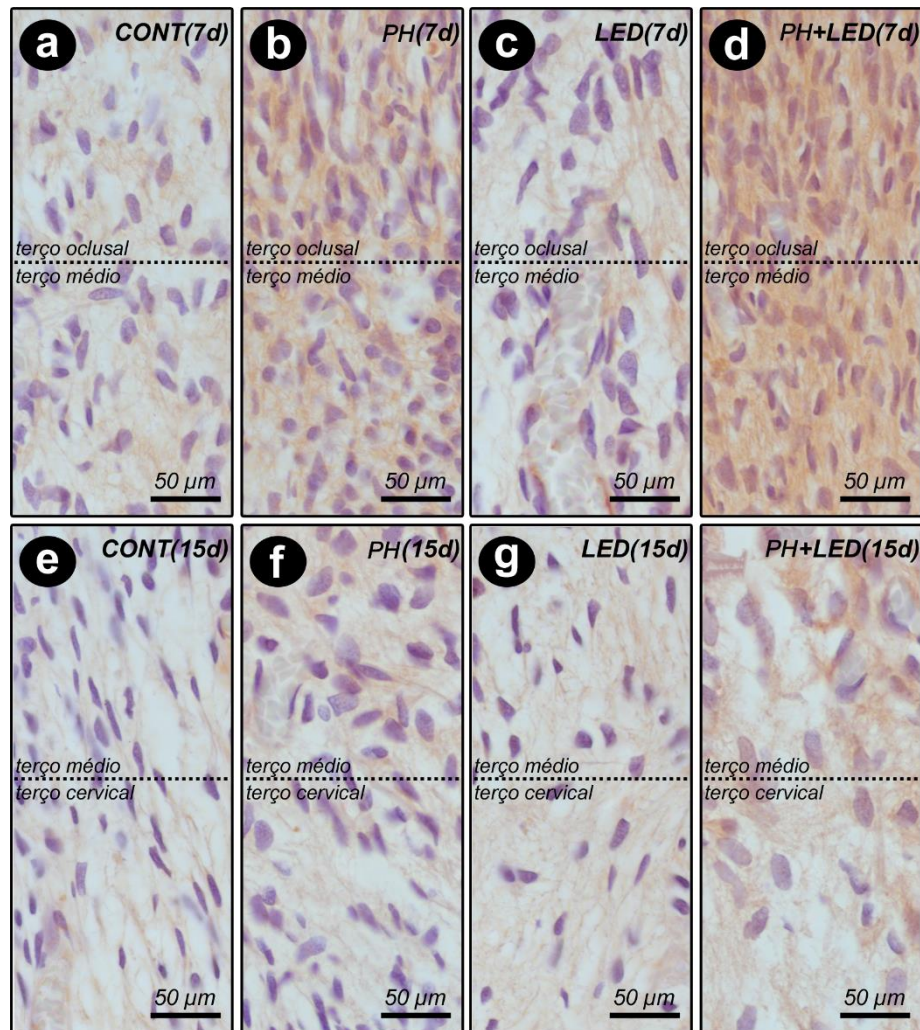
|          |                | T0                  |    |     |        | T1                  |    |     |        | T2                  |    |     |        | T3                 |    |     |        |
|----------|----------------|---------------------|----|-----|--------|---------------------|----|-----|--------|---------------------|----|-----|--------|--------------------|----|-----|--------|
|          |                | CONT                | PH | LED | PH+LED | CONT                | PH | LED | PH+LED | CONT                | PH | LED | PH+LED | CONT               | PH | LED | PH+LED |
| Oclusal  | Mediana        | 1                   | 3  | 1   | 3      | 1                   | 2  | 1   | 2      | 1                   | 2  | 1   | 2      | 1                  | 1  | 1   | 1      |
|          |                | *CONT×PH = 0,002    |    |     |        | *CONT×PH = 0,002    |    |     |        | *CONT×PH = 0,031    |    |     |        | CONT×PH = 1,000    |    |     |        |
|          |                | *LED×PH+LED = 0,002 |    |     |        | *LED×PH+LED = 0,002 |    |     |        | *LED×PH+LED = 0,008 |    |     |        | LED×PH+LED = 1,000 |    |     |        |
|          | Valor <i>p</i> | CONT×LED = 1,000    |    |     |        | CONT×LED = 1,000    |    |     |        | CONT×LED = 1,000    |    |     |        | CONT×LED = 1,000   |    |     |        |
|          |                | PH×PH+LED = 1,000   |    |     |        | PH×PH+LED = 1,000   |    |     |        | PH×PH+LED = 0,366   |    |     |        | PH×PH+LED = 1,000  |    |     |        |
| Médio    | Mediana        | 1                   | 2  | 1   | 3      | 1                   | 2  | 1   | 2      | 1                   | 1  | 1   | 1      | 1                  | 1  | 1   | 1      |
|          |                | *CONT×PH = 0,002    |    |     |        | *CONT×PH = 0,002    |    |     |        | CONT×PH = 0,500     |    |     |        | CONT×PH = 1,000    |    |     |        |
|          |                | *LED×PH+LED = 0,002 |    |     |        | *LED×PH+LED = 0,002 |    |     |        | LED×PH+LED = 0,500  |    |     |        | LED×PH+LED = 1,000 |    |     |        |
|          | Valor <i>p</i> | CONT×LED = 1,000    |    |     |        | CONT×LED = 1,000    |    |     |        | CONT×LED = 1,000    |    |     |        | CONT×LED = 1,000   |    |     |        |
|          |                | *PH×PH+LED = 0,010  |    |     |        | PH×PH+LED = 1,000   |    |     |        | PH×PH+LED = 1,000   |    |     |        | PH×PH+LED = 1,000  |    |     |        |
| Cervical | Mediana        | 1                   | 2  | 1   | 2      | 1                   | 1  | 1   | 1      | 1                   | 1  | 1   | 1      | 1                  | 1  | 1   | 1      |
|          |                | *CONT×PH = 0,002    |    |     |        | CONT×PH = 1,000     |    |     |        | CONT×PH = 1,000     |    |     |        | CONT×PH = 1,000    |    |     |        |
|          |                | *LED×PH+LED = 0,002 |    |     |        | LED×PH+LED = 1,000  |    |     |        | LED×PH+LED = 1,000  |    |     |        | LED×PH+LED = 1,000 |    |     |        |
|          | Valor <i>p</i> | CONT×LED = 1,000    |    |     |        | CONT×LED = 1,000    |    |     |        | CONT×LED = 1,000    |    |     |        | CONT×LED = 1,000   |    |     |        |
|          |                | PH×PH+LED = 1,000   |    |     |        | PH×PH+LED = 1,000   |    |     |        | PH×PH+LED = 1,000   |    |     |        | PH×PH+LED = 1,000  |    |     |        |

CONT×PH e LED×PH+LED = Teste Wilcoxon ( $p < 0,05$ ); PH×PH+LED = Teste Mann-Whitney ( $p < 0,05$ ). \*O asterisco representa

diferença estatisticamente significante entre os grupos.



**Fig. 5** Imagens representativas da análise imunohistoquímica de IL-17 imediatamente (T0) e 7 dias (T1) após o clareamento nos terços oclusal e médio. Baixo padrão de imunomarcacão nos terços oclusal e médio nos grupos CONT e LED em T0 e T1. Padrão severo de imunomarcacão nos grupos PH e PH+LED em T0 no terço oclusal, sendo que apenas o grupo PH apresentou reduçã o da imunomarcacão para moderada no terço médio. Grupo PH com moderado padrão de imunomarcacão em T1, e grupo PH+LED com padrão severo no terço oclusal e moderado no terço médio em T1. [Análise imunoistoquímica de IL-17 - 1000×].



**Fig. 6** Imagens representativas da análise imunohistoquímica de IL-23 7 dias (T1) após o clareamento nos terços oclusal e médio e 15 dias (T2) após o clareamento nos terços médio e cervical. Baixo padrão de imunomarcção nos terços oclusal, médio e cervical nos grupos CONT e LED em T1 e T2. Padrão moderado de imunomarcção nos grupos PH e PH+LED nos terços oclusal e médio em T1 e no terço médio em T2. Baixo padrão de imunomarcção nos grupos PH e PH+LED no terço cervical em T2. [Análise imunoistoquímica de IL-23 - 1000×].

#### *Análise do marcador de auxiliar no processo de mineralização*

Imagens representativas da marcação imunológica da OCN são mostradas na Fig 5. A Tabela 6 mostra que em T0 os grupos LED, Cont e PH+LED apresentaram baixa imunomarcção de OCN, enquanto que o grupo PH apresentou padrão moderado no terço médio, gerando diferença significativa com o grupo PH+LED ( $p < 0,001$ ). Em T1, a imunomarcção foi severa no terço oclusal para o grupo PH+LED, que diferiu estatisticamente dos demais tratamentos. O grupo PH apresentou imunomarcção moderada, mas também

apresentou marcação maior dos que os grupos LED e CONT. Estes foram semelhantes e apresentaram baixa imunomarcação.

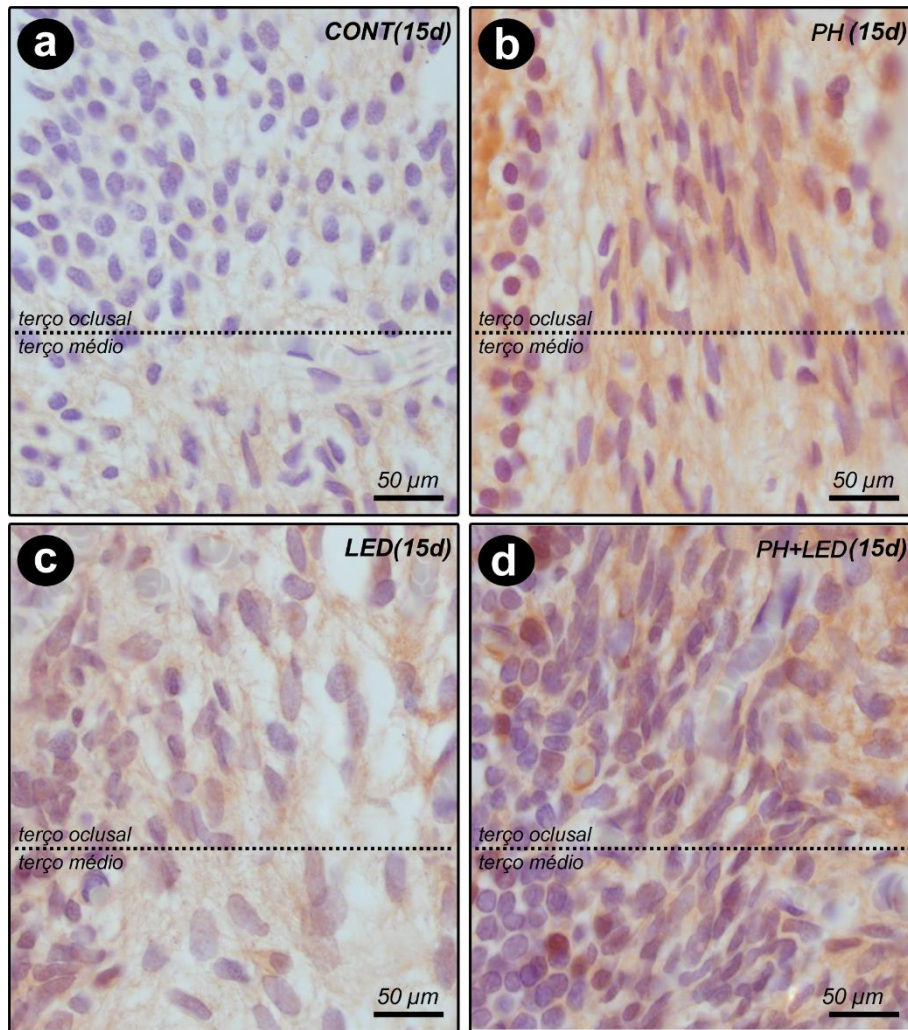
Em T2, com exceção do grupo CONT, todos grupos foram semelhantes e apresentaram severa imunomarcação nos terços oclusal e médio. Em T3, o grupo LED apresentou redução da marcação, variando de severa para baixa, permanecendo com mesmo escore que o grupo controle nos terços oclusal e médio ( $p = 1,000$ ). Já os grupos PH e PH+LED apresentaram marcação moderada no terço oclusal, sendo semelhantes entre si ( $p = 0,001$ ) e diferindo estatisticamente dos grupos CONT e LED, respectivamente ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 6** Mediana e valores de “ $p$ ” atribuídos à marcação imunoistoquímica da OCN no tecido pulpar de acordo com o grupo experimental e os períodos de análise.

|          |           | T0                  |    |     |        | T1                  |    |     |        | T2                 |    |     |        | T3                  |    |     |        |
|----------|-----------|---------------------|----|-----|--------|---------------------|----|-----|--------|--------------------|----|-----|--------|---------------------|----|-----|--------|
|          |           | CONT                | PH | LED | PH+LED | CONT                | PH | LED | PH+LED | CONT               | PH | LED | PH+LED | CONT                | PH | LED | PH+LED |
| Oclusal  | Mediana   | 1                   | 1  | 1   | 1      | 1                   | 2  | 1   | 3      | 1                  | 3  | 3   | 3      | 1                   | 2  | 1   | 2      |
|          |           | CONT×PH = 1,000     |    |     |        | *CONT×PH = 0,002    |    |     |        | *CONT×PH = 0,002   |    |     |        | *CONT×PH = 0,002    |    |     |        |
|          | Valor $p$ | LED×PH+LED = 1,000  |    |     |        | *LED×PH+LED = 0,002 |    |     |        | LED×PH+LED = 1,000 |    |     |        | *LED×PH+LED = 0,002 |    |     |        |
|          |           | CONT×LED = 1,000    |    |     |        | CONT×LED = 1,000    |    |     |        | *CONT×LED = 0,002  |    |     |        | CONT×LED = 1,000    |    |     |        |
|          |           | PH×PH+LED = 1,000   |    |     |        | *PH×PH+LED = 0,010  |    |     |        | PH×PH+LED = 1,000  |    |     |        | PH×PH+LED = 1,000   |    |     |        |
| Médio    | Mediana   | 1                   | 2  | 1   | 1      | 1                   | 2  | 1   | 2      | 1                  | 3  | 3   | 3      | 1                   | 1  | 1   | 1      |
|          |           | *CONT×PH = 0,002    |    |     |        | *CONT×PH = 0,002    |    |     |        | *CONT×PH = 0,002   |    |     |        | CONT×PH = 1,000     |    |     |        |
|          | Valor $p$ | LED×PH+LED = 1,000  |    |     |        | *LED×PH+LED = 0,002 |    |     |        | LED×PH+LED = 1,000 |    |     |        | LED×PH+LED = 1,000  |    |     |        |
|          |           | CONT×LED = 1,000    |    |     |        | CONT×LED = 1,000    |    |     |        | *CONT×LED = 0,002  |    |     |        | CONT×LED = 1,000    |    |     |        |
|          |           | *PH×PH+LED = <0,001 |    |     |        | PH×PH+LED = 1,000   |    |     |        | PH×PH+LED = 1,000  |    |     |        | PH×PH+LED = 1,000   |    |     |        |
| Cervical | Mediana   | 1                   | 1  | 1   | 1      | 1                   | 1  | 1   | 1      | 1                  | 1  | 1   | 1      | 1                   | 1  | 1   | 1      |
|          |           | CONT×PH = 1,000     |    |     |        | CONT×PH = 1,000     |    |     |        | CONT×PH = 1,000    |    |     |        | CONT×PH = 1,000     |    |     |        |
|          | Valor $p$ | LED×PH+LED = 1,000  |    |     |        | LED×PH+LED = 1,000  |    |     |        | LED×PH+LED = 1,000 |    |     |        | LED×PH+LED = 1,000  |    |     |        |
|          |           | CONT×LED = 1,000    |    |     |        | CONT×LED = 1,000    |    |     |        | CONT×LED = 1,000   |    |     |        | CONT×LED = 1,000    |    |     |        |
|          |           | PH×PH+LED = 1,000   |    |     |        | PH×PH+LED = 1,000   |    |     |        | PH×PH+LED = 1,000  |    |     |        | PH×PH+LED = 1,000   |    |     |        |

CONT×PH e LED×PH+LED = Teste Wilcoxon ( $p < 0,05$ ); PH×PH+LED = Teste Mann-Whitney ( $p < 0,05$ ). \*O asterisco representa

diferença estatisticamente significante entre os grupos.



**Fig. 7** Imagens representativas da análise imunohistoquímica de OCN 15 dias (T2) após o clareamento nos terços oclusal e médio. Baixo padrão de imunomarcacão nos terços oclusal e médio no grupo CONT em T2. Padrão severo de imunomarcacão nos terços oclusal e médio nos grupos PH, LED e PH+LED em T2. [Análise imunoistoquímica de Osteocalcina - 1000×].

## 4 DISCUSSÃO

Com o questionamento frequente da segurança das técnicas clareadoras tradicionais, alternativas que possam alcançar resultados satisfatórios gerando o mínimo de comprometimento tecidual agudo e a longo prazo representariam um avanço considerável para a Odontologia.

Diversos estudos comprovaram que a aplicação isolada do LED violeta promove alteração cromática discreta, sendo mais promissor o seu emprego quando associado com produtos contendo peróxido de hidrogênio em concentrações inferiores a 17,5% [25,37-39]. Sendo assim, torna-se pertinente estudos que avaliem a resposta biológica de tratamentos que utilizam este sistema associado ou não com géis menos concentrados.

Dentre os efeitos adversos provocados pelo tratamento clareador tradicional destaca-se o estabelecimento de um processo inflamatório pulpar [40] e o aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias [41,42], que desencadeiam respostas dolorosas tão comumente relatadas em análises clínicas [43,44]. Frente a isso, no presente trabalho foi observado que o LED Violeta utilizado isoladamente ou associado ao gel clareador não influenciou na resposta inflamatória, sendo aceita a primeira hipótese nula do estudo.

Destaca-se, porém, que mesmo sendo utilizado um gel à base de peróxido de hidrogênio a 17,5%, os grupos que receberam aplicação do peróxido, independentemente da irradiação com o LED violeta, apresentaram áreas de necrose tecidual e infiltrado inflamatório severo imediatamente ao término do tratamento, com redução do infiltrado inflamatório para discreto aos 7 dias e evoluindo para a ausência de células inflamatórias aos 15 e 30 dias, condição observada durante todo o período experimental nos grupos CONT e LED. Estes achados mostram que apesar do dente do rato favorecer uma maior dissociação do peróxido de hidrogênio para o tecido pulpar, há um recrutamento de células mesenquimais indiferenciadas que promovem a reestruturação tecidual após 30 dias de tratamento [45].

Observou-se também que no período imediato houve aumento da imunomarcagem de IL-17 e IL-23 no grupo PH+LED em comparação com o grupo PH, mostrando que o LED exerceu efeito significativo quando associado com gel, rejeitando a segunda hipótese. Possivelmente esta marcação severa esteja relacionada à capacidade da luz de tornar os dentes mais sensíveis, quando comparado ao tratamento realizado exclusivamente com o gel clareador. Esta hipótese é corroborada pelos resultados de Gallinari et al. [39], que constatou que o tratamento associado (PH+LED) tornou os dentes mais sensíveis aos estímulos frios, que

permaneceram sensibilizados após o término do tratamento clareador. A duração da sensibilização dentária neste estudo clínico também justifica os resultados encontrados no presente estudo, que revelou imunomarcacão moderada mesmo após 15 dias de tratamento.

Com relação à análise de OCN, apesar de todos os grupos diferirem do controle, apresentando imunomarcacão severa aos 15 dias, baixo padrão foi observado no grupo LED aos 30 dias, enquanto que neste tempo os grupos que receberam a aplicacão do gel clareador (PH e PH+LED) permaneceram com marcacão moderada. Este resultado mostra que a luz em sua forma isolada ou associada não induziu a maior expressão no tecido pulpar, aceitando a terceira hipótese nula. Estes achados corroboram com o estudo de Benetti et al. [26], pois observaram que, devido à produçã da matriz dentinária ainda permanecer ativa aos 30 dias, ocorre maior expressã de OCN no tecido pulpar, o que está associado à fibrose tecidual [46].

A maturacão das fibras de colágeno, que constituem aproximadamente 34% do tecido conjuntivo da polpa [47], também representam outro sinal de envelhecimento atribuído ao tecido após o tratamento clareador convencional [48]. Diante disso, é importante destacar que o LED violeta utilizado isoladamente influenciou apenas na maturacão das fibras colágenas dentinárias rejeitando, portanto, a quarta hipótese nula do estudo e aceitando a quinta hipótese.

De uma forma geral, os grupos que não receberam a aplicacão de gel clareador (CONT e LED) apresentaram diminuicão de fibras dentinárias maduras, corroborando com os achados de Terayama et al. [48], que observaram que os grupos clareados apresentaram maior quantidade de fibras colágenas maduras do que o grupo controle. Esta reduçã pode estar relacionada ao envelhecimento natural do tecido no modelo experimental utilizado, pois a dentina vai se mineralizando naturalmente com reduçã de suas fibras colágenas. Entretanto, os mesmos grupos apresentaram aumento das fibras imaturas dentinárias à partir dos 15 dias, sendo este processo menos intenso para o grupo LED, o que indica uma maturacão um pouco mais acelerada promovida pela luz.

Acredita-se que o LED violeta possa influenciar e promover alteraçõs restritas ao conteúdo orgânico dentinário, uma vez que o seu comprimento de onda (405-410 nm) [49] limita a sua açã nas camadas mais superficiais dos tecidos dentários. Estes achados corroboram o estudo de Barboza et al. [50], que constataram que a bioestabilidade do colágeno dentinário não foi influenciada pelo LED violeta. Além disso, vale ressaltar que o gel à base de peróxido de hidrogênio a 17,5%, de maneira isolada ou associado à luz, também não influenciou na maturacão das fibras colágenas do tecido pulpar, o que pode estar relacionado à menor

concentração utilizada, em contraste a outros estudos realizados com concentração de 35%, que aceleraram este processo [31,48].

Os resultados desta pesquisa contribuíram para a compreensão da influência do LED violeta sobre os tecidos dentários, porém o menor volume do tecido pulpar e dos tecidos duros, bem como o tempo de reparo devem ser considerados na interpretação dos resultados, não devendo ser extrapolados diretamente para uma condição humana. Assim, consideramos oportuno que outros estudos sejam realizados para validar estes resultados em outros modelos experimentais.

Por fim, apesar do LED violeta influenciar no processo de maturação das fibras colágenas dentinárias, esta alteração ocorreu de forma branda, o que garante segurança biológica ao tratamento nos parâmetros avaliados, principalmente quando comparamos aos danos oxidativos severos associados à terapia clareadora tradicional.

## **5 CONCLUSÃO**

A terapia com LED violeta não induziu inflamação e fibrose no tecido pulpar, apesar de acelerar a maturação das fibras de colágeno da dentina e, quando associada ao peróxido de hidrogênio, pode tornar os dentes mais sensíveis.

## REFERÊNCIAS

1. 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>
2. Almeida LC, Soares DG, Gallinari MO, de 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>
3. Lee DH, Lim BS, Lee YK, Yang HC (2006) Effects of hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) on alkaline phosphatase activity and matrix mineralization of odontoblast and osteoblast cell lines. *Cell Biol Toxicol* 22:39-46. <https://doi.org/10.1007/s10565-006-0018-z>
4. 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>
5. 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)
6. Perdigão J (2010) Dental whitening: revisiting the myths. *Northwest Dent* 89:19-26.
7. 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>
8. 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>
9. 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:e59-64. <https://doi.org/10.1016/j.tripleo.2009.12.002>
10. Benetti F, Gomes-Filho JE, Ferreira LL, Sivieri-Araújo G, Ervolino E, Briso ALF, Cintra LTA (2018) Concentration-dependent effect of bleaching agents on the immunolabelling 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>

11. Ferreira LL, Gomes-Filho JE, Benetti F, Carminatti M, Ervolino E, Briso ALF, Cintra LTA (2018) The effect of dental bleaching on pulpal tissue response in a diabetic animal model: a study of immunoregulatory cytokines. *Int Endod J* 51:347-356. <https://doi.org/10.1111/iej.12852>
12. 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>
13. Hu Y, Xiong H, Peng B (2013) Expression of a cytokine, interleukin-23, in experimental periapical lesions. *Int Endod J* 46:896-903. <https://doi.org/10.1111/iej.12077>
14. Renard E, Gaudin A, Bienvenu G, Amiaud J, Farges JC, Cuturi MC, Moreau A, Alliot-Licht B (2016) Immune cells and molecular networks in experimentally induced pulpitis. *J Dent Res* 95:196-205. <https://doi.org/10.1177/0022034515612086>
15. Kolls JK, Linden A (2004) Interleukin-17 family members and inflammation. *Immunity* 21:467–476. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2004.08.018>
16. Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, Turner H, Murphy TL, Murphy KM, Weaver CT (2005) Interleukin 17-producing CD4<sup>+</sup> effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol* 6:1123–1132. <https://doi.org/10.1038/ni1254>
17. Park H, Li Z, Yang XO, Chang SH, Nurieva R, Wang YH, Wang Y, Hood L, Zhu Z, Tian Q, Dong C (2005) A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol* 6:1133–1141. <https://doi.org/10.1038/ni1261>
18. Iwakura Y, Ishigame H (2006) The IL-23/IL-17 axis in inflammation. *J Clin Invest* 116:1218–1222. <https://doi.org/10.1172/JCI28508>
19. Ohyama H, Kato-Kogoe N, Kuhara A, Nishimura F, Nakasho K, Yamanegi K, Yamada N, Hata M, Yamane J, Terada N (2004) The involvement of IL-23 and the Th17 pathway in periodontitis. *J Dent Res* 88:633–638. <https://doi.org/10.1177/0022034509339889>
20. Zanin F (2016) Recent advances in dental bleaching with Laser and LEDs. *Photomed Laser Surg* 34:135-136. <https://doi.org/10.1089/pho.2016.4111>
21. Brugnera AP, Nammour S, Rodrigues JA, Mayer-Santos E, Freitas PM, Brugnera A, Junior, Zanin F (2020) Clinical evaluation of in-office dental bleaching using a violet light-

- emitted diode. *Photobiomodul Photomed Laser Surg* 38:98–104. <https://doi.org/10.1089/photob.2018.4567>
22. Kury M, Wada EE, Silva DPD, Tabchoury CPM, Giannini M, Cavalli V (2020) Effect of violet LED light on in-office bleaching protocols: a randomized controlled clinical trial. *J Appl Oral Sci* 28:e20190720. <https://doi.org/10.1590/1678-7757-2019-0720>
  23. Almeida ENM, Bessegato JF, Santos DDL, Souza Rastelli AN, Bagnato VS (2019) Violet LED for non-vital tooth bleaching as a new approach. *Photodiagnosis Photodyn Ther* 28:234–237. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2019.08.024>
  24. Gallinari MO, Fagundes TC, Silva LM, Almeida Souza MB, Barboza ACS, Briso ALF (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>
  25. Gallinari MO, Cintra L, Souza M, Barboza A, Esteves L, Fagundes TC, Briso A (2019) Clinical analysis of color change and tooth sensitivity to violet LED during bleaching treatment: A case series with split-mouth design. *Photodiagnosis Photodyn Ther* 27:59–65. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2019.05.016>
  26. Benetti F, Briso ALF, Carminatti M, Araujo Lopes JM, Barbosa JG, Ervolino E, Gomes-Filho JE, Cintra LTA (2019) The presence of osteocalcin, osteopontin and reactive oxygen species positive in pulp tissue after dental bleaching. *Int Endod J* 52:665–675. <https://doi.org/10.1111/iej.13049>
  27. Matsui S, Takahashi C, Tsujimoto Y, Matsushima K (2009) Stimulatory effects of low-concentration reactive oxygen species on calcification ability of human dental pulp cells. *J Endod* 35:67–72. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2008.08.034>
  28. Toledano M, Yamauti M, Osorio E, Osorio R (2011) Bleaching agents increase metalloproteinases-mediated collagen degradation in dentin. *J Endod* 37:1668–1672. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2011.08.003>
  29. Karaarslan ES, Özmen ZC, Aytac F, Bicakci AA, Buldur M, Aydogan L, Hologlu F, Özkocak B (2018) Evaluation of biochemical changes in dental tissues after different office bleaching methods. *Hum Exp Toxicol* 38:389–397. <https://doi.org/10.1177/0960327118817103>

30. Sato C, Rodrigues FA, Garcia DM, Vidal CM, Pashley DH, Tjäderhane L, Carrilho MR, Nascimento FD, Tersariol IL (2013) Tooth bleaching increases dentinal protease activity. *J Dent Res* 92:187-92. <https://doi.org/10.1177/0022034512470831>
31. Cintra LTA, Ferreira LL, Benetti F, Gastéllum AA, Gomes-Filho JE, Ervolino E, Briso ALF (2017) Effect of dental bleaching on pulpal tissue response in a diabetic model. *Int Endod J* 50:790-798. <https://doi.org/10.1111/iej.12852>
32. Lago ADN, Ferreira WDR, Furtado GS (2017) Dental bleaching with the use of Violet light only: Reality or Future? *Photodiagnosis Photodyn Ther* 17:124-126. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2016.11.014>
33. Barbosa JG, Benetti F, Oliveira Gallinari M, Carminatti M, Silva ABD, Lopes INI, Briso ALF, Cintra LTA (2020) Bleaching gel mixed with MI Paste Plus reduces penetration of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and damage to pulp tissue and maintains bleaching effectiveness. *Clin Oral Investig* 24:1299–1309. <https://doi.org/10.1007/s00784-019-03009-5>
34. Marson FC, Gonçalves RS, Silva CO, Cintra LT, Pascotto RC, Santos PH, Briso AL (2015) Penetration of hydrogen peroxide and degradation rate of bleaching products. *Oper Dent* 40:72-79. <https://doi.org/10.2341/13-270-L>
35. Lillie RD (1954) *Histopathologic technique and practical histochemistry*, 2nd edn. Blakinston, New York.
36. Junqueira LC, Montes GS, Sanchez EM (1982) The influence of tissue section thickness on the study of collagen by the picrosirius-polarization method. *Histochemistry* 74:153-156. <https://doi.org/10.1007/BF00495061>
37. Rastelli AN, Dias HB, Carrera ET, Barros AC, Santos DD, Panhóca CH, Bagnato VS (2018) Violet LED with low concentration carbamide peroxide for dental bleaching: a case report. *Photodiagnosis Photodyn Ther* 23:270-272. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2018.06.021>
38. Silva Daltro TW, Gomes de Almeida SA, Dias MF, Lins-Filho PC, Silva CHV, Guimarães RP (2020) The influence of violet LED light on tooth bleaching protocols: In vitro study of bleaching effectiveness. *Photodiagnosis Photodyn Ther* 32:102052. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2020.102052>
39. Gallinari MO, Cintra LTA, Barboza ACS, Silva LMAV, Alcantara S, Santos PH, Fagundes TC, Briso ALF (2020) Evaluation of the color change and tooth sensitivity in

treatments that associate violet LED with carbamide peroxide 10 %: a randomized clinical trial of a split-mouth design. *Photodiagnosis Photodyn Ther* 30:101679. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2020.101679>

40. Kashima-Tanaka M, Tsujimoto Y, Kawamoto K, Senda N, Ito K, Yamazaki M (2003) Generation of free radicals and/or active oxygen by light or laser irradiation of hydrogen peroxide or sodium hypochlorite. *J Endod* 29:141-143. <https://doi.org/10.1097/00004770-200302000-00013>

41. Lu HX, Xial MZ, Niu ZY, Guo XM, Zhao SL, Wang HG, Guo HY (2002) Effect of IL-1ra on human dental pulp cells and pulpal inflammation. *Int Endod J* 35:807-811. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2591.2002.00542.x>

42. Silva AC, Faria MR, Fontes A, Campos MS, Cavalcanti BN (2009) Interleukin-1 beta and interleukin-8 in healthy and inflamed dental pulps. *J Appl Oral Sci* 17:527-532. <https://doi.org/10.1590/s1678-77572009000500031>

43. Watkins LR & Maier SF (2002) Beyond neurons: evidence that immune and glial cells contribute to pathological pain states. *Physiol Rev* 82:981-1011. <https://doi.org/10.1152/physrev.00011.2002>

44. Miller RJ, Jung H, Bhangoo SK, White FA (2009) Cytokine and chemokine regulation of sensory neuron function. *Handb Exp Pharmacol* 194:417-449. [https://doi.org/10.1007/978-3-540-79090-7\\_12](https://doi.org/10.1007/978-3-540-79090-7_12)

45. Benetti F, Gomes-Filho JE, Ferreira LL, Ervolino E, Briso AL, Sivieri-Araújo G, Dezan-Júnior E, Cintra LT (2017) Hydrogen peroxide induces cell proliferation and apoptosis in pulp of rats after dental bleaching in vivo: effects of the dental bleaching in pulp. *Arch Oral Biol* 81:103-109. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2017.04.013>

46. Dong J, Ma Q (2017) Osteopontin enhances multi-walled carbon nanotube-triggered lung fibrosis by promoting TGF- $\beta$ 1 activation and myofibroblast differentiation. *Part Fibre Toxicol* 14:18. <https://doi.org/10.1186/s12989-017-0198-0>

47. Abrahão IJ, Martins MD, Katayama E, Antoniazzi JH, Segmentilli A, Marques MM (2006) Collagen analysis in human tooth germ papillae. *Braz Dent J* 17:208-212. <https://doi.org/10.1590/s0103-64402006000300006>

48. Terayama AM, Benetti F, Araújo Lopes JM, Barbosa JG, Silva IJP, Sivieri-Araújo G, Briso ALF, Cintra LTA (2020) Influence of low-level laser therapy on inflammation, collagen fiber maturation, and tertiary dentin deposition in the pulp of bleached teeth. *Clin Oral Investig* 24:3911-3921. <https://doi.org/10.1007/s00784-020-03258-9>
  
49. Buchalla W, Attin T (2007) External bleaching therapy with activation by heat, light or laser-a systematic review. *Dent Mater* 23:586-596. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2006.03.018>
  
50. Barboza ACS, Santos PH, Vale LR, Oliveira Gallinari M, Assmann A, Vidal CMP, Fagundes TC, Briso ALF (2020) Dental bleaching with violet LED: effects on dentin color change, resin-dentin bond strength, hybrid layer nanohardness and dentinal collagen biostability. *Photodiagnosis Photodyn Ther* 8:102141. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2020.102141>

## 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 **"Estudo in vivo da resposta inflamatória, maturação de fibras colágenas e expressão de marcadores da mineralização no tecido pulpar de ratos submetidos a terapias clareadoras com LED Violeta"**, Processo FOA nº 00420-2019, 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:** 16 de Fevereiro de 2021.

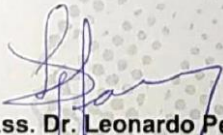
**DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL:** até 16 de Março de 2021.

### CERTIFICATE

We certify that the study entitled **"In vivo study of inflammatory response, maturation of collagen fibers, and expression of mineralization markers in pulp tissue of rats submitted to bleaching therapy using Violet LED"**, Protocol FOA nº 00420-2019, 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:** February 16, 2021.

**DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT:** March 16, 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

## ANEXO B

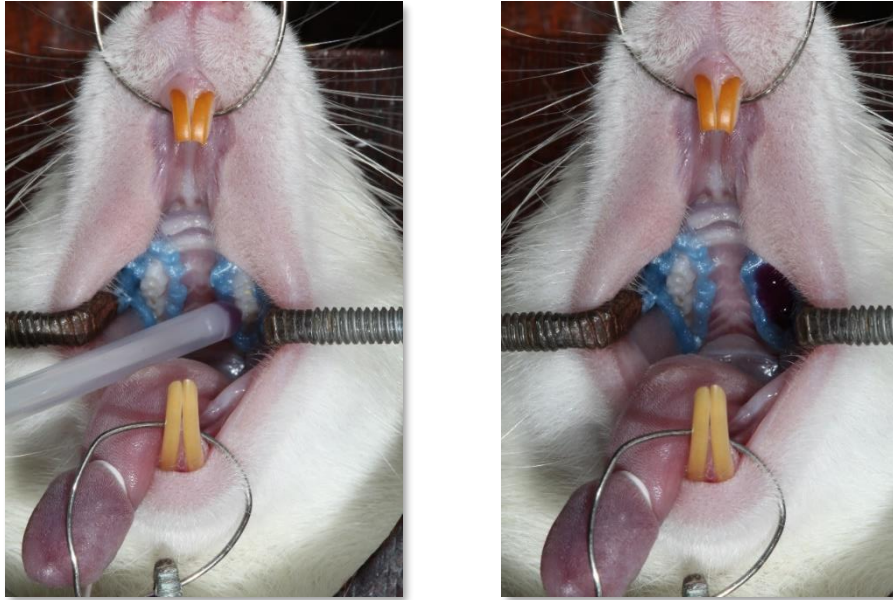
**Figura 1** – Titulação do PH com permanganato de potássio.



**Figura 2** – Procedimento de anestesia intramuscular.



**Figura 3** – Aplicação de 4 $\mu$ L do gel à base de PH a 17,5% sobre a superfície do esmalte com o auxílio de uma pipeta própria para líquidos viscosos (Microman E M100E, Gilson, Inc, Middleton, Wisconsin, USA).



**Figura 4** – Animais pertencentes ao lote LED recebendo a irradiação com o Fotoclareador Bright Maxx Whitening, associado ou não ao agente clareador à base de peróxido de hidrogênio à 17,5%.



**Figura 5** – Verificação das hemimaxilas mantidas em solução de EDTA a 10% para comprovação de sua total desmineralização.



**Figura 6** – Peças histológicas após processamento e inclusão em parafina.

