

**NANCY TOMOKO SACONO**

*Efeito citotóxico trans-amelodentínario de um gel clareador com 35% de peróxido de hidrogênio aplicado sobre dentes restaurados ou não com resina composta*





**NANCY TOMOKO SACONO**

**EFEITO CITOTÓXICO TRANS-AMELODENTINÁRIO DE  
UM GEL CLAREADOR COM 35% DE PERÓXIDO DE  
HIDROGÊNIO APLICADO SOBRE DENTES  
RESTAURADOS OU NÃO COM RESINA COMPOSTA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas - Área de Odontopediatria - da Faculdade de Odontologia de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista, para obtenção do Título de Doutor em Ciências Odontológicas.

**Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto de Souza Costa**

**Araraquara**

**2011**

Sacono, Nancy Tomoko.

Efeito citotóxico trans-amelodentinário de um gel clareador com 35% de peróxido de hidrogênio aplicado sobre dentes restaurados ou não com resina composta / Nancy Tomoko Sacono. – Araraquara: [s.n.], 2011.

79 f. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista,  
Faculdade de Odontologia

Orientador : Prof. Dr. Carlos Alberto de Souza Costa

1. Clareamento de dente 2. Peróxido de hidrogênio 3. Odontoblastos  
I. Título.

**NANCY TOMOKO SACONO**

**EFEITO CITOTÓXICO TRANS-AMELODENTINÁRIO DE  
UM GEL CLAREADOR COM 35% DE PERÓXIDO DE  
HIDROGÊNIO APLICADO SOBRE DENTES  
RESTAURADOS OU NÃO COM RESINA COMPOSTA**

COMISSÃO JULGADORA

TESE PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR

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

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

3º Examinador: Prof. Dr. Marcelo Giannini

4º Examinador: Prof. Dr. Edson Alves de Campos

5º Examinador: Prof. Dr. Marcelo Ferrarezi de Andrade

Araraquara, 10 de Janeiro de 2011.

## Dados Curriculares

### **Nancy Tomoko Sacono**

NASCIMENTO	19 de setembro de 1977 – São Paulo/SP
FILIAÇÃO	Tomioiti Sacono Tomiko Sacono
1999/2002	Curso de Graduação em Odontologia Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP
2003/2004	Estágio de Atualização na Disciplina de Odontopediatria Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP
2005/2007	Curso de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas, Área de Concentração Odontopediatria. Nível Mestrado, Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP
2007/2010	Curso de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas, Área de Concentração Odontopediatria. Nível Doutorado, Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP

# *Dedicatória*

---

## **À Deus**

Que me auxiliou em todos os momentos difíceis e decisivos da minha vida, me abençoando e dando forças para continuar lutando....

## **PEGADAS NA AREIA**

*Uma noite tive um sonho...*

*Sonhei que estava andando na praia com o Senhor e através do céu, passavam cenas da minha vida.*

*Para cada cena que passava, percebi que eram deixados dois pares de pegadas na areia: um era meu e o outro era do Senhor.*

*Quando a última cena passou diante de nós, olhei para trás, para as pegadas na areia e notei que muitas vezes, no caminho da minha vida, havia apenas um par de pegadas na areia.*

*Notei também que isso aconteceu nos momentos mais difíceis e angustiantes da minha vida. Isso me aborreceu deveras e perguntei então ao Senhor:*

*- Senhor, Tu me disseste que, uma vez que resolvi te seguir, Tu andarias sempre comigo, em todo o caminho. Contudo, notei que durante as maiores atribulações do meu viver, havia apenas um par de pegadas na areia. Não compreendo porque nas horas em que eu mais necessitava de Ti, Tu me deixaste sozinho.*

*O Senhor me respondeu:*

*- Meu querido filho. Jamais eu te deixaria nas horas de provas e de sofrimento. Quando viste, na areia, apenas um par de pegadas, foi exatamente aí que eu te carreguei nos braços.*

## *Dedicatória*

---

Aos meus pais, **Tomiko** e **Tomoiti**

Agradeço por todo o esforço, incentivo, carinho e pela compreensão nas minhas ausências. Os finais de semana que passei no laboratório me privaram da convivência em família, mas me auxiliaram na concretização de um sonho! E todo esforço vai valer à pena. Espero poder retribuir tudo que fizeram por mim! Amo muito vocês!

À minha irmã, **Cintia** à minha sobrinha **Megumi**

Que há tantos anos não vejo! Que estão lutando por um futuro melhor, fora do nosso país. Muitas saudades... Quero agora que você, Cintia, possa buscar uma formação profissional aqui, no Brasil, junto à sua família!

Ao meu grande amor **Rodrigo**

Pelos onze anos de companheirismo. Você é o meu porto seguro, sempre compreensivo, sempre me ajudando e incentivando tudo que faço! Sei que posso contar com você em qualquer situação e espero passar o resto da minha vida ao seu lado meu amor! Te amo!

## *Agradecimentos especiais*

---

### **Ao Prof. Dr. Carlos Alberto de Souza Costa**

Muito obrigada, querido professor, por todos os ensinamentos valiosos, tanto na área da pesquisa quanto na moral, ética e valores humanos. O senhor é um exemplo de competência, dedicação e perseverança que levarei para o resto da minha vida! Devo muito ao senhor e serei eternamente grata por todas as oportunidades que me proporcionou durante o curso de doutorado. Obrigada também por todos os conselhos, pela compreensão e por todo carinho recebido.

### **À Profa. Dr. Josimeri Hebling**

Agradeço pelo auxílio durante a análise estatística do trabalho, pela disponibilidade em todos os momentos da tese, por todo ensinamento passado, sempre com muita paciência. Para mim a senhora é um exemplo de professora completa, que consegue se sobressair sempre com brilhantismo tanto no ensino quanto na pesquisa. Realiza tudo com perfeição e mesmo assim é um exemplo de humildade, além de tratar todos os alunos com uma delicadeza incrível!

### **Às minhas queridas amigas Ana Paula e Diana**

Sem vocês meninas, esta tese não existiria!! Vocês me ajudaram em todas as partes do trabalho e sempre ficaram ao meu lado, me apoiando nos fracassos e comemorando nas vitórias! Levarei vocês no meu coração, para sempre!!! Ana, você é um exemplo de dedicação e superação! Além disso, possui um coração de ouro! Muito obrigada pela sua amizade! Diana, “bichinha arretada” que corre atrás de seus sonhos e os alcança! Tenho certeza que você terá muito sucesso em sua vida, pois é uma pessoa determinada!



## *Agradecimentos especiais*

---

Aos meus queridos amigos **Pedro e Flávia**

Pedro, muito obrigada por sua amizade sincera, desde a graduação! Obrigada por toda a ajuda no laboratório e por todo ensinamento na área da Biologia Molecular! Você é uma pessoa dotada de uma inteligência incrível e que está sempre disposta a compartilhar seus conhecimentos com quem quer que seja e isso transparece sua humildade! Flavitcha, você é uma pessoa com o coração maior que o mundo, sempre solícita em ajudar a todos, sem qualquer tipo de interesse. Você tem um lindo coração e merece ser muito feliz!!! Muito obrigada pela sua amizade incontestável!

Às minhas queridas amigas **Camila e Fer Basso**

Muito obrigada pela amizade! Cá, você será sempre minha amiga do peito e sei que sempre poderei contar com sua ajuda. Qualquer coisa eu vou gritar mesmo! Fer, nestes últimos anos tive a oportunidade de te conhecer melhor e pude perceber a pessoa maravilhosa que você é! Muito obrigada por todo apoio e pelas conversas no laboratório. Ah, e principalmente por assumir a coordenação do laboratório juntamente com a Diana!!

## *Agradecimentos*

---

À Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, representada pelo digníssimo Diretor **Prof. Dr. José Cláudio Martins Segalla** e pela Vice-Diretora **Profa. Dra. Andréia Affonso Barreto Montandon**.

Ao **Departamento de Clínica Infantil da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP**, representados pelo Chefe de Departamento Prof. Dr. Luiz Gonzaga Gandini Jr. e pela Vice-Chefe Profa. Dra. **Ângela Cristina Cilense Zuanon**.

Aos professores da Disciplina de Odontopediatria **Ângela Cristina Cilense Zuanon, Cyneu Aguiar Pansani, Elisa Maria Aparecida Giro, Josimeri Hebling, Lourdes Aparecida Martins dos Santos-Pinto e Rita de Cássia Loiola Cordeiro**, pela convivência sempre próxima e agradável. Sempre muito solícitos e gentis.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP**, representado pela Profa. Dra. Josimeri Hebling (Coordenadora) e pelo Prof. Dr. Edson Alves de Campos (Vice-coordenador).

Aos **professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas, Áreas de concentração de Odontopediatria, Ortodontia e Dentística Restauradora**, pela atenção e ensinamentos.

## *Agradecimentos*

---

À secretaria do Departamento de Fisiologia e Patologia, em especial à **Silvana**, sempre solícita e eficiente na resolução dos problemas e envios de relatórios FAPESP.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES** e à **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP** pela concessão de bolsa de estudo e auxílio pesquisa.

Às minhas amigas do curso de doutorado **Cármén, Juliana, Michele e Simone** por todos os momentos compartilhados nas dificuldades e nas alegrias. Obrigada Cármén por ser essa pessoa tão carinhosa e animada. Obrigada Ju pelo companheirismo e incentivo. Obrigada Mi pelo exemplo de perseverança e superação. Obrigada Si pela amizade, pelas conversas e pela cumplicidade. Você é uma pessoa muito especial para mim! Uma verdadeira amiga!

Aos amigos do laboratório **Adriano Lima, Lu, Pops, Carol Pratti, Fer Vargas, Carol Chávez, Joyce, Rafa, Lívia, Elaine, Jonas, Daphine, Gabi, Carol Petilli, Juliana Rosa e Taísa** pela convivência. Agradeço em especial as “desorientadas” Rafa e Joyce pela aprendizagem na orientação de alunos de iniciação científica.

Ao querido amigo **Kina**, pelos conselhos e palavras de apoio, incentivos e pela amizade! Sempre agradando a todos com diversas gentilezas que alegravam nossos dias de trabalhos pesados.

## *Agradecimentos*

---

À **Juliana Pirola** e ao professor **Cleverton Roberto** pela amizade. Ju, você nunca me negou ajuda em momento algum! Obrigada. Prof. Roberto, obrigada pela companhia durante o almoço e por todo o incentivo durante a pesquisa.

À **Amanda** pela companhia durante os finais de semana, sempre muito disposta e com uma alegria contagiante!

A todos os funcionários desta faculdade, em especial **Eliezer, Gea, Guiomar, Luis, Noêmia, Nunes, Nilton, Lena e Claudinha** pelas conversas na portaria e nos corredores durante os intervalos. Muito obrigada pelo carinho de vocês.

A todos os funcionários da seção de Pós-graduação, em especial para **Mara** por toda atenção e carinho com que nos atende.

Aos funcionários do Departamento de Clínica Infantil, **Soninha, Dulce, Totó, Pedrinho, Odete e Tânia** por estarem sempre nos ajudando.

Aos funcionários da Biblioteca, **Adriano, Ceres, Eliane, Maria Helena, Maria Inês, Maria José, Marley, Odete e Silvia**, por todo carinho e por estarem sempre dispostos a ajudar.

À empresa **ACECIL**, em nome do **Dr. Marcos**, pela esterilização dos discos por óxido de etileno, sempre muito solícitos e eficientes.

## SUMÁRIO

RESUMO.....	14
ABSTRACT.....	17
1 INTRODUÇÃO.....	20
2 PROPOSIÇÃO.....	27
3 MATERIAL E MÉTODO.....	29
3.1 <i>Obtenção dos discos</i> .....	29
3.2 <i>Preparo cavitário</i> .....	30
3.3 <i>Confecção das restaurações de resina composta</i> .....	31
3.4 <i>Procedimento de armazenagem e termociclagem dos discos</i> .....	32
3.5 <i>Câmara Pulpar Artificial (CPA)</i> .....	32
3.6 <i>Procedimentos de esterilização dos discos</i> .....	34
3.7 <i>Cultivo das células MDPC-23</i> .....	34
3.8 <i>Procedimento clareador</i> .....	34
3.9 <i>Obtenção dos extratos</i> .....	36
3.10 <i>Avaliação do metabolismo celular (teste de MTT)</i> .....	37
3.11 <i>Análise em microscopia eletrônica de varredura</i> .....	38
3.12 <i>Tratamento estatístico dos dados</i> .....	39
4 RESULTADO.....	42
5 DISCUSSÃO.....	51
6 CONCLUSÃO.....	64
7 REFERÊNCIAS.....	66
8 ANEXOS.....	78

---

# *Resumo*

---



Sacono NT. Efeito citotóxico trans-amelodentinário de um gel clareador com 35% de peróxido de hidrogênio aplicado sobre dentes restaurados ou não com resina composta [Tese de Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2011.

## RESUMO

O objetivo do estudo foi avaliar a citotoxicidade trans-amelodentinária de um gel clareador com 35% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aplicado sobre dentes com ou sem restauração de resina composta e submetidos ou não a procedimento de envelhecimento. Cavidades preparadas em discos de esmalte/dentina obtidos de dentes bovinos íntegros foram restauradas com sistema adesivo auto-condicionante e resina composta. Os discos foram armazenados em solução aquosa por 24 horas ou 6 meses e o procedimento de termociclagem foi realizado somente nos grupos armazenados por 6 meses. Os discos foram posicionados em câmaras pulpares artificiais e distribuídos em grupos: Íntegros 24 horas; Íntegros 24 horas clareados; Íntegros 6 meses; Íntegros 6 meses clareados; Restaurados 24 horas; Restaurados 24 horas clareados; Restaurados 6 meses; e Restaurados 6 meses clareados. O gel clareador foi aplicado sobre os discos por 15 minutos (1 aplicação) ou por 45 minutos (3 aplicações consecutivas de 15 minutos cada), sendo que os extratos (meio de cultura em contato com a dentina + componentes dos gel clareador que se difundiram através dos discos) foram recolhidos e aplicados por 1 hora sobre células odontoblastóides MDPC-23 em cultura (12.500 células/cm<sup>2</sup>). Para o experimento no qual o gel clareador foi aplicado somente uma vez, observou-se redução significativa do metabolismo celular apenas para o grupo de dentes restaurados quando comparado ao controle (íntegros 24 horas não clareados) e ao grupo restaurado não clareado, independente do tempo de armazenamento (Tukey, p<0,05). Quando o gel clareador foi aplicado por três vezes consecutivas, houve diminuição do metabolismo celular estatisticamente significativa em todos os grupos clareados (Mann-Whitney, p<0,05), sendo observadas intensas alterações morfológicas das células MDPC-23.

Entretanto, não houve diferença com relação a presença de restauração e o tempo de armazenamento. Dentro das condições experimentais, foi possível concluir que a aplicação do gel clareador com 35% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> causou intenso efeito citotóxico para as células odontoblastóides em cultura, independente da presença da restauração e do tempo de armazenamento, somente quando aplicado por três vezes consecutivas (45 minutos de clareamento) sobre o esmalte.

**Palavras-chave:** Clareamento de dente; peróxido de hidrogênio; odontoblastos.



---

# *Abstract*

---



Sacono NT. Trans-enamel and trans-dentinal cytotoxic effects of a 35% hydrogen peroxide bleaching gel applied on non-restored and restored teeth with composite resin [Tese de Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2011.

## **ABSTRACT**

The aim of this in vitro study was to evaluate the trans-enamel and trans-dentinal cytotoxic effects of a 35% hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) bleaching gel applied on non-restored or restored teeth, submitted or not to aging by water storage and thermocycling. Enamel/dentin discs were obtained from bovine central incisors and restored or not with self-etching adhesive system and composite resin. These discs were storage in water for 24 hours or 6 months (aging). Thus, the discs were adapted individually in artificial pulp chambers and distributed according to the following treatments: non-restored teeth stored for 24 hours submitted or not to bleaching procedures; non-restored teeth stored for 6 months submitted or not to bleaching procedures; restored teeth stored for 24 hours submitted or not to bleaching procedures; and restored teeth stored for 6 months submitted or not to bleaching procedures. The bleaching gel was left in contact with the enamel surface for 15 minutes (1 application) or for 45 minutes (3 applications of 15 minutes each). The extracts (culture medium in contact to the dentin surface of the discs + bleaching agents components that diffused across the discs) were collected and applied on previously cultured MDPC-23 cells (12.500 cells/cm<sup>2</sup>) for 1 hour. Cell metabolism was evaluated by the MTT assay and cell morphology by scanning electron microscopy. One application of bleaching gel in the enamel surface of the discs caused a significant decrease in cell metabolism only in the restored discs in comparison with control discs (unbleached and non-restored discs stored for 24 hours) and unbleached restored discs, regardless of the storage time (Tukey, p<0.05). On the other hand, bleaching agent applied for three consecutive times on enamel caused a significant decreased in cell metabolism in all bleached discs (Mann-Whitney, p<0.05). However, there were no differences between restored and

## *Abstract*

---

non-restored teeth and between storage for 24 hours or 6 months. Under the tested experimental conditions, it may be concluded that the extracts collected after tooth bleaching with a 35% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for three consecutive times (45 minutes) caused severe toxic effects on cultured odontoblast-like cell MDPC-23, regardless of the presence of composite resin restoration and storage time.

**Key-words:** Tooth bleaching; hydrogen peroxide; odontoblasts.

---

# *Introdução*

---



## 1 INTRODUÇÃO

O escurecimento dental, independente do fator etiológico, interfere negativamente na aparência do sorriso, sendo que a demanda por procedimentos estéticos que proporcionem um sorriso mais harmonioso tem aumentado significativamente (Zantner et al.<sup>97</sup>, 2007). Em especial, o clareamento dental, alcançou grande popularidade no campo da Odontologia Estética por ser um tratamento mais conservador quando comparado a outros métodos mais invasivos, onde os dentes são desgastados mecanicamente para posterior cimentação de facetas ou coroas totais de resina ou porcelana.

O escurecimento da estrutura dentária pode ocorrer devido a fatores intrínsecos, extrínsecos ou a combinação de ambos. Os fatores intrínsecos são resultantes de alterações na natureza molecular e estrutural do esmalte e da dentina e sua origem pode ser pré-eruptiva, como por exemplo, trauma, alteração genética, administração de tetraciclina e consumo de altos níveis de flúor e pós-eruptiva, como traumas e o próprio processo natural de envelhecimento dentário (Minoux, Serfaty<sup>63</sup>, 2008). Já as alterações extrínsecas são superficiais e resultantes da ação dos corantes dos alimentos e fumo que se depositam sobre o esmalte (Watts, Addy<sup>95</sup>, 2001). O tipo de manchamento da estrutura dentária é de extrema importância na determinação do procedimento a ser utilizado. Enquanto a resolução dos manchamentos extrínsecos pode ser um simples polimento, as alterações intrínsecas requerem um procedimento mais complexo.

O clareamento dental surgiu inicialmente para dentes não vitais e diversos medicamentos eram utilizados tais como cloro, hipoclorito de sódio, perborato de sódio e peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), associados ou não ao calor (Howell<sup>44</sup>, 1980; Truman<sup>92</sup>, 1864). Na década de 60, a mistura de perborato de sódio com água foi substituída por perborato e peróxido de hidrogênio de 30-35%, o qual intensificou o efeito clareador da técnica.

Atualmente existem duas técnicas principais de clareamento dental, sendo que uma delas é a de consultório e a outra é a caseira, a qual é

realizada sob supervisão do dentista (Al-Salehi et al.<sup>3</sup>, 2006). A técnica caseira depende, em grande parte, da colaboração do paciente, além disso os resultados do clareamento caseiro são mais demorados e, por essa razão, a técnica de clareamento em consultório tem sido bastante empregada, principalmente em casos de alteração de cor severa ou quando um tratamento rápido é desejado, sendo, com muita frequência, associado à aplicação de luz, cujo objetivo é acelerar os efeitos do peróxido de hidrogênio (Buchalla, Attin<sup>13</sup>, 2007).

Diversos tipos de luz podem ser utilizados, tais como luz halógena, arco de xenônio, diodo emissor de luz (LED) e laser. A ação da luz baseia-se na termocatálise, resultando em aumento da decomposição do  $H_2O_2$  em cerca de 2 vezes. Apenas uma pequena parte da energia proveniente da luz é convertida em calor e para favorecer essa conversão, vários agentes clareadores têm sido misturados com corantes para aumentar a absorção de luz. Entretanto, pesquisas recentes fornecem evidências de que a catalisação dos géis clareadores por meio da utilização de fontes de luz não é necessária para se obter melhores resultados estéticos. Assim, a aplicação da luz não traria contribuição comprovada no resultado final do clareamento dentário (Bruzell et al.<sup>12</sup>, 2009; Hein et al.<sup>43</sup>, 2003; Lima et al.<sup>56</sup>, 2009).

O clareamento em consultório é geralmente realizado utilizando agentes clareadores com altas concentrações de peróxido de hidrogênio, o qual é um agente químico oxidante termoinstável devido à presença de dois oxigênios ligados entre si ( $HO_2H$ ), os quais são eletronegativos facilitando, desta forma, a interação com elétrons das moléculas de hidrogênio. Portanto, o  $H_2O_2$  se decompõe facilmente em água e oxigênio e a quebra da ligação entre as moléculas de oxigênio resulta na formação de radicais livres e espécies reativas de oxigênio (EROs). As EROs são moléculas altamente reativas e as mais comumente formadas à partir da degradação do  $H_2O_2$  são os íons hidroxila ( $OH^\cdot$ ), peridroxil ( $HO_2^\cdot$ ) e superóxido ( $O_2^\cdot$ ), os quais são responsáveis pelo clareamento da estrutura dentária.

A coloração do elemento dental é proveniente de moléculas orgânicas presentes na estrutura do dente que apresentam longas cadeias com duplas ligações e anéis aromáticos, denominadas cromóforos. O clareamento dental consiste em uma reação de oxidação de cromóforos (oxi-redução) incorporados pela estrutura dental. Esses cromóforos são fracionados em cadeias moleculares menores pela quebra das duplas ligações de carbono, o que resulta em moléculas menores gerando uma redução do índice de absorção de luz pela estrutura dental e, conseqüentemente, levando ao clareamento do dente (Kawamoto, Tsujimoto<sup>48</sup>, 2004).

Tem sido relatado que as reações dos radicais livres não se limitam somente às moléculas pigmentadas do dente, podendo reagir potencialmente com qualquer tipo de molécula orgânica (Kawamoto, Tsujimoto<sup>48</sup>, 2004). Assim, os radicais livres provenientes da decomposição do agente clareador podem causar danos às células pulpares por meio de estresse oxidativo (Kawamoto, Tsujimoto<sup>48</sup>, 2004; Li<sup>55</sup>, 1996). As espécies reativas de oxigênio estão relacionadas a diferentes tipos de danos ao DNA das células, o que pode resultar em apoptose celular (Kanno et al.<sup>47</sup>, 2003; Li<sup>55</sup>, 1996). A geração de EROs é um mecanismo de controle de organismos aeróbios inerente ao processo natural de envelhecimento celular. Entretanto, quando existe um desequilíbrio entre a produção intracelular de enzimas antioxidantes, como a catalase e superóxido desmutase, e os níveis de EROs (exógeno ou endógeno), ocorre acúmulo excessivo de radicais livres no organismo, o que pode ocasionar atraso no ciclo celular, apoptose e/ou redução da proliferação celular (Martindale, Holbrook<sup>59</sup>, 2002; Shackelford et al.<sup>79</sup>, 2000). Além disso, o desenvolvimento de processos inflamatórios, principalmente reações crônicas que envolvem estímulos agressivos de baixa intensidade, também são fontes significantes de estresse oxidativo, aumentando ainda mais a geração de EROs na região agredida (Shackelford et al.<sup>79</sup>, 2000).

Tem sido demonstrado que o baixo peso molecular do peróxido de hidrogênio não só favorece sua difusão através do esmalte e da dentina, permitindo a obtenção de dentes mais claros, mas também pode ocasionar

danos à polpa (Benetti et al.<sup>7</sup>, 2004; Camargo et al.<sup>14</sup>, 2007; Gökay et al.<sup>33</sup>, 2000; Gökay et al.<sup>36</sup>, 2000; Hanks et al.<sup>39</sup>, 1993). As evidências de hipersensibilidade após o procedimento clínico de clareamento dental sugerem a capacidade de infiltração dos peróxidos em direção à polpa (Dalh, Pallesen<sup>24</sup>, 2003; Nathanson<sup>67</sup>, 1997; Schulte et al.<sup>77</sup>, 1994). Essa infiltração pulpar pode ser influenciada por vários fatores, tais como tempo de contato do gel clareador com o esmalte, pressão positiva pulpar, bem como pressão osmótica e concentração do agente clareador (Hanks et al.<sup>39</sup>, 1993).

Com o objetivo principal de entender a possível relação entre a penetração de componentes dos géis clareadores nas estruturas dentais e seus efeitos tóxicos sobre células pulpares, estudos recentes avaliaram a citotoxicidade de géis clareadores com altas concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (20-38%) (Coldebella et al.<sup>18</sup>, 2009; Dias Ribeiro et al.<sup>27</sup>, 2009; Sacono et al.<sup>72</sup>, 2010; Trindade et al.<sup>91</sup>, 2009) em células pulpares MDPC-23. As células odontoblastóides MDPC-23, as quais foram estabelecidas por Hanks et al.<sup>40</sup> no ano de 1998, são células de linhagem imortalizada, isoladas da papila dentária de molares de camundongos (Mouse Dental Papillae Cells). Estas células possuem características fenotípicas semelhantes aos odontoblastos, pois apresentam alta atividade de fosfatase alcalina, capacidade de se organizar em nódulos epitelióides e definida expressão de sialoproteína e fosforina da dentina (Hanks et al.<sup>40</sup>, 1998). Os autores aplicaram o gel clareador sobre discos de esmalte e dentina e observaram que componentes do agente clareador foram capazes de atravessar a estrutura dentária e causar intensos efeitos tóxicos sobre as células pulpares em cultura, caracterizado por notável redução no metabolismo celular associado a profundas alterações na morfologia e até mesmo a morte das células.

Outro fator muito importante na difusão dos agentes clareadores é a presença de restaurações. Em elementos dentais restaurados, devido a interface existente entre o dente e a restauração, os agentes clareadores podem penetrar através do esmalte e da dentina em proporções ainda maiores (Benetti et al.<sup>7</sup>, 2004) para atingir a câmara pulpar (Bowles, Thompson<sup>8</sup>, 1986).



Segundo Owens et al.<sup>69</sup> (1998), a contração de polimerização, o estresse térmico e a absorção de água dos materiais restauradores são alguns fatores que podem facilitar a penetração do peróxido de hidrogênio através de microfendas formadas na interface dente/restauração. Estudos in vitro utilizando incisivos humanos durante o clareamento externo com peróxido de hidrogênio a 30% e peróxido de carbamida a 10-35%, constataram que, em dentes restaurados, houve maior difusão de peróxido para a câmara pulpar quando comparados aos dentes sem restaurações (Gökay et al.<sup>33</sup>, 2000; Gökay et al.<sup>36</sup>, 2000). Um estudo mais recente avaliou a penetração de um agente clareador a base de peróxido de hidrogênio a 38% para o interior da câmara pulpar de dentes bovinos e humanos após clareamento de consultório (Camargo et al.<sup>14</sup>, 2007). O agente clareador foi aplicado por 40 minutos sobre a superfície de dentes íntegros e de dentes restaurados com resina composta, cimento de ionômero de vidro e cimento de ionômero de vidro modificado por resina. Os autores observaram que os dentes humanos foram mais permeáveis quando comparados aos dentes bovinos e que a presença de restauração aumentava significativamente a difusão do peróxido de hidrogênio para o interior da câmara pulpar. Entretanto, todos esses estudos avaliaram a penetração do peróxido de hidrogênio em dentes recém-restaurados, sem qualquer tipo de degradação da interface dente/restauração. Tem sido demonstrado que a interface adesiva das restaurações de resina composta sofre degradação ao longo do tempo, pela ação de forças mecânicas (mastigação), alterações de temperaturas, fenômenos bioquímicos e presença constante de umidade (De Munck et al.<sup>25</sup>, 2005). Essa degradação pode favorecer ainda mais a difusão dos agentes clareadores até o tecido pulpar. Portanto, uma avaliação criteriosa da qualidade das restaurações de resina composta torna-se importante previamente à realização de clareamento dentário, principalmente no caso de restaurações muito amplas e antigas.

Assim, devido à capacidade de difusão, através do esmalte e dentina, de produtos liberados pelos géis clareadores utilizados em consultório, a qual pode ser potencializada pela presença de restaurações dentárias, parece interessante avaliar o possível efeito citotóxico trans-amelodentinário de um gel

clareador aplicado sobre dentes com ou sem restaurações de resina composta submetidos ou não ao processo de envelhecimento in vitro.

---

## *Proposição*

---



## **2 PROPOSIÇÃO**

### **OBJETIVO GERAL**

Avaliar o possível efeito citotóxico trans-amelodentinário de componentes de um agente clareador com 35% de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) aplicado sobre a face vestibular de dentes bovinos com ou sem presença de cavidade restaurada com resina composta, submetida ou não ao envelhecimento em água associado ao processo de termociclagem.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- 1- Verificar o possível efeito citotóxico do agente clareador com 35% de  $H_2O_2$  sobre células de linhagem odontoblástica MDPC-23;
- 2- Avaliar se a presença de restaurações de resina composta exerce influência sobre a citotoxicidade do agente clareador com 35% de  $H_2O_2$ ;
- 3- Avaliar se o procedimento de envelhecimento in vitro de discos de esmalte/dentina, através do armazenamento em água associada à termociclagem, influencia o possível efeito citotóxico do agente clareador com 35% de  $H_2O_2$ .

---

## *Material e Método*

---



### 3 MATERIAL E MÉTODO

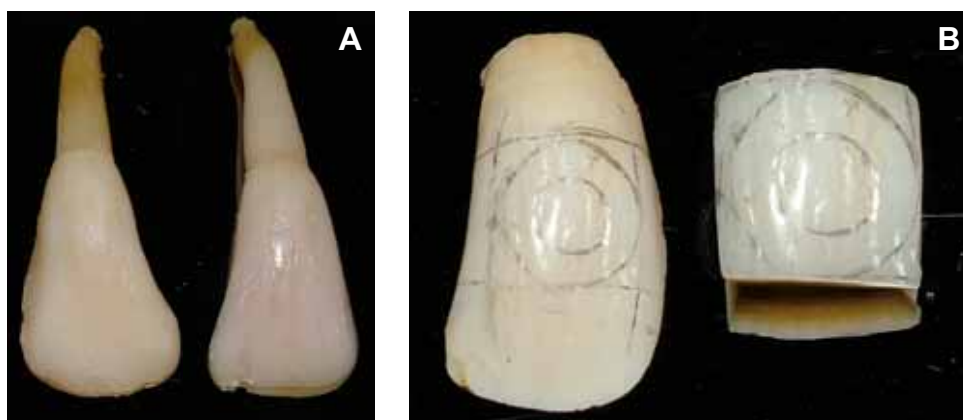
#### 3.1 Obtenção dos discos

Duzentos e doze discos obtidos a partir de dentes bovinos (Figura 1A) foram selecionados a partir dos seguintes critérios:

*Critérios de inclusão:* incisivos permanentes, inferiores, obtidos a partir de novilhos entre 20 e 30 meses de idade.

*Critérios de exclusão:* presença de trincas no esmalte, cálculo no terço médio da coroa, desgaste excessivo do terço incisal, alterações morfológicas da coroa, hipoplasias de esmalte e dentes que sofreram tratamento com algum agente químico para a remoção de restos de ligamento periodontal que possa ter alterado a superfície do esmalte.

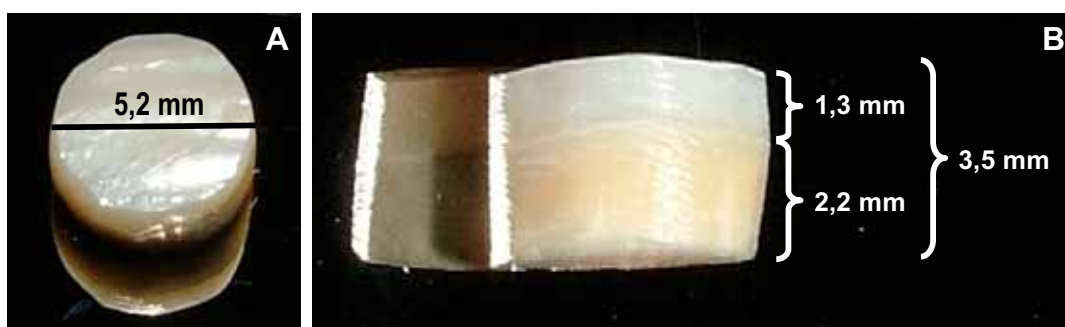
Após remoção mecânica de restos periodontais e outros resíduos da superfície dos dentes, foram realizadas delimitações na superfície média vestibular do esmalte por meio de marcações definidas com auxílio de anel de silicone (Rodimar rolamentos Ltda. – Araraquara, SP, Brasil), para obtenção de blocos de esmalte/dentina. Os blocos com dimensões de 6,0 x 6,0 mm foram obtidos manualmente, utilizando-se para isto disco diamantado dupla face (KG Sorensen, Barueri, SP, Brasil) montado em peça reta (Dabi Atlante, Ribeirão Preto, SP, Brasil) sob refrigeração constante em água, seguindo as marcações pré-determinadas (Figura 1B).



**FIGURA 1-** **A-** Aspecto dos dentes bovinos selecionados para o estudo. **B-** Obtenção do bloco de esmalte/dentina a partir do terço médio da face vestibular da coroa de incisivos bovinos.

Em seguida, os espécimes foram arredondados com auxílio de ponta diamantada cilíndrica (n° 1095 KG Sorensen, Barueri, SP, Brasil), em motor de alta rotação (Dabi Atlante, Ribeirão Preto, SP, Brasil) até a obtenção de discos com 5,2 mm de diâmetro (Figura 2A). A superfície dentinária foi regularizada por meio de desgastes com lixas d'água de granulação 400 e 600 (T469-SF-Noton, Saint-Gobam Abrasivos Ltda., Jundiaí, SP, Brasil) com movimentos giratórios manuais para cada granulação.

Os discos envolvendo esmalte e dentina foram submetidos a medições de espessura por meio de um paquímetro digital (Modelo 500-144B, Mitutoyo Sul América Ltda., São Paulo, SP, Brasil), sendo realizada a padronização da espessura de 3,5 mm (Figura 2B).

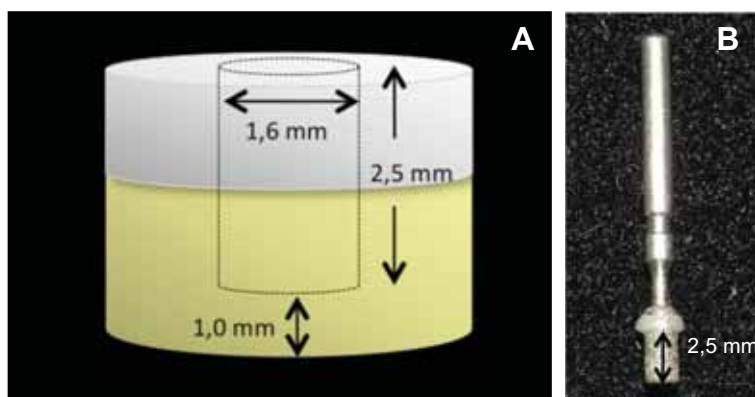


**FIGURA 2-** **A-** Diâmetro dos discos obtidos a partir de incisivos bovinos. **B-** Espessura dos discos de esmalte/dentina.

### 3.2 Preparo cavitário

Após a confecção dos discos de esmalte/dentina, preparos cavitários com 1,6 mm de diâmetro e 2,5 mm de profundidade (Figura 3A) foram realizados com auxílio de ponta diamantada cilíndrica (n° 2094 KG Sorensen, Cotia, SP, Brasil) (Figura 3B) em cento e seis discos escolhidos aleatoriamente. A cada quatro preparos cavitários a ponta diamantada foi trocada<sup>42</sup>. Visando a padronização da profundidade do preparo cavitário em 2,5 mm, um batente de resina composta foi confeccionado na extremidade ativa das pontas diamantadas. Dessa maneira, diante da espessura de 3,5 mm do

disco de esmalte/dentina, o remanescente dentinário foi padronizado em 1,0 mm, simulando preparos cavitários profundos.



**FIGURA 3- A-** Esquema representativo das dimensões do preparo cavitário realizado nos discos que foram restaurados com resina composta. **B-** Ponta diamantada cilíndrica com batente confeccionado em resina composta.

O preparo cavitário foi confeccionado com auxílio de motor de alta rotação sob refrigeração constante, por meio de jatos de água/ar, para evitar o aquecimento da estrutura dental.

### **3.3 Confeção das restaurações de resina composta**

As restaurações de resina composta foram realizadas nas cavidades previamente confeccionadas. Os materiais dentários utilizados para restaurar as cavidades foram manipulados e aplicados de acordo com as recomendações dos fabricantes. As restaurações foram realizadas da seguinte maneira:

- Utilização do sistema adesivo (Adper SE Plus, 3M ESPE, St. Paul, Minnesota, EUA): aplicação do líquido A seguida de aplicação do líquido B, por fricção, durante 20 segundos. Secagem com jato de ar por 10 segundos, nova aplicação do líquido B seguida de leve jato de ar. Polimerização com aparelho de luz halógena (Curing Light XL 300, 3M Dental Products, St. Paul, Minnesota, EUA) por 10 segundos, com intensidade de luz igual ou superior a  $450 \text{ mW/cm}^2$ , previamente



determinado por um radiômetro digital (Modelo 100 P/N 10503, Demetron Research Corporation, Danbury, CT, EUA);

- Restauração de resina composta: incrementos de 2,0 mm de resina composta nanoparticulada fotopolimerizável Filtek™ Z350 (3M ESPE, Irvine, Califórnia, EUA), na cor A2, foram aplicados na cavidade com auxílio de espátula Thompson. A polimerização foi realizada por luz halógena por um período de 20 segundos após colocar cada incremento de resina composta.

### **3.4 Procedimento de armazenagem e termociclagem dos discos**

Todos os discos de esmalte/dentina foram colocados nos compartimentos das placas acrílicas esterilizadas de 24 compartimentos com 1 mL de água destilada. Os espécimes foram armazenados em estufa à 37°C por 24 horas ou 6 meses. A água foi trocada diariamente durante o período de 6 meses.

Somente os discos armazenados por 6 meses foram submetidos à termociclagem em Máquina Simuladora de Ciclagem Térmica (modelo MSCT-3, Elquip, São Carlos, SP, Brasil), totalizando 20.000 ciclos, com temperatura variando entre 5 e 55°C e com tempo de imersão de 30 segundos em cada banho.

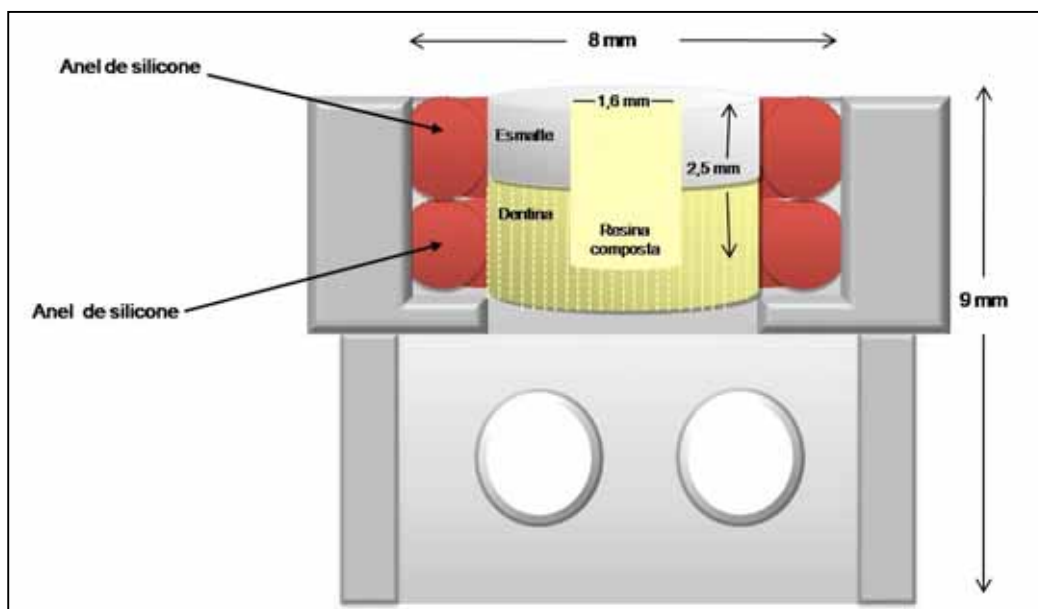
### **3.5 Câmara Pulpar Artificial (CPA)**

Para o desenvolvimento desta pesquisa, foram utilizadas câmaras pulpares artificiais (CPAs), onde foram adaptados discos de esmalte/dentina já com as restaurações de resina composta confeccionadas e discos sem restaurações. Estes dispositivos foram desenvolvidos no Laboratório de Patologia Experimental e Biomateriais da Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP, onde também foi realizada a parte experimental deste projeto.

Cada CPA apresenta 2 compartimentos. No topo do compartimento superior (4 mm de altura) há uma abertura de 8 mm de diâmetro, enquanto que em sua superfície inferior ocorre uma redução do diâmetro de abertura para 6 mm, permitindo o posicionamento adequado do disco de esmalte/dentina. O compartimento inferior apresenta perfurações circulares com a finalidade de permitir contato direto do meio de cultura com a superfície de dentina do disco.

Previamente a montagem dos discos nas CPAs, a smear-layer presente sobre a dentina foi removida por meio de aplicação, com *microbrush*, de solução de EDTA 0,5 M, pH 7,2 por 30 segundos, seguido de lavagem com água deionizada esterilizada, antes de serem utilizados. Este procedimento teve como objetivo a limpeza superficial da dentina, promovendo a desobstrução dos túbulos dentinários<sup>20</sup>.

Todos os discos obtidos foram então posicionados nas CPAs (Figura 4) entre dois anéis de silicone (Rodimar rolamentos Ltda. – Araraquara, SP, Brasil) com diâmetro interno de 4,47 mm e espessura de 1,78 mm.



**FIGURA 4-** Representação esquemática da Câmara Pulpar Artificial (CPA) com disco com restauração de resina composta em posição (adaptado de Trindade et al<sup>91</sup>, 2009).

### **3.6 Procedimento de esterilização dos discos**

Todos os discos posicionados nas CPAs foram embalados individualmente e esterilizados por meio de gás de óxido de etileno<sup>54</sup>.

### **3.7 Cultivo das células MDPC-23**

Células imortalizadas de linhagem odontoblástica MDPC-23 foram cultivadas em garrafas plásticas de 25 cm<sup>2</sup> (Costar Corp., Cambridge, MA, EUA) em meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, SIGMA Chemical Co., St. Louis, MO, EUA) contendo 10% de soro fetal bovino (GIBCO, Grand Island, NY, EUA), 100 IU/mL e 100 µg/mL, respectivamente de penicilina e estreptomicina e 2 mmol/L de glutamina (GIBCO, Grand Island, NY, EUA) em uma atmosfera umedecida à 37°C, com 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de ar.

Estas células foram subcultivadas a cada três dias na concentração de 30.000 células/cm<sup>2</sup>, até se obter o número de células adequado para a execução do experimento. Para a realização do teste de citotoxicidade, 12.500 células/cm<sup>2</sup> foram semeadas em compartimentos de placas acrílicas esterilizadas de 24 compartimentos (Costar Corp., Cambridge, MA, EUA). Em seguida, as placas foram armazenadas por 6 dias em incubadora na temperatura de 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de ar.

### **3.8 Procedimento clareador**

Em capela de fluxo laminar vertical (Bio Protector Plus 12 – Veco, São Paulo, SP, Brasil), as CPAs contendo os discos de esmalte/dentina foram posicionadas nos compartimentos das placas acrílicas esterilizadas de 24 compartimentos com a superfície de dentina voltada para o fundo do compartimento. Aproximadamente 1 mL de meio de cultura foi colocado em cada compartimento de tal maneira que a superfície de esmalte do disco permaneceu voltada para cima e totalmente exposta, permitindo a aplicação do

agente clareador e a superfície dentinária permaneceu em contato direto com o meio de cultura.

O gel clareador, contendo 35% de peróxido de hidrogênio, selecionado para este estudo (Whiteness HP, FGM Produtos Odontológicos Ltda., Florianópolis, SC, Brasil) (Figura 5) foi manipulado e aplicado de acordo com as recomendações do fabricante.



**FIGURA 5-** Gel clareador contendo 35% de peróxido de hidrogênio (Whiteness HP, FGM).

Em capela de fluxo laminar, a superfície de esmalte dos discos foi lavada com 1 mL de água deionizada autoclavada, com auxílio de pipetas, com concomitante sucção. Em seguida uma quantidade aproximada de 10 mg do gel clareador foi aplicada sobre a superfície de esmalte do disco com auxílio de *microbrush*. Dessa forma, no caso dos dentes restaurados, o gel clareador foi aplicado tanto sobre a superfície da restauração, quanto nas suas margens. E no caso dos dentes não restaurados, toda a superfície de esmalte do disco recebeu a aplicação do gel clareador.

Após aplicação, o agente clareador permaneceu por 15 minutos sobre a superfície de esmalte do disco, sendo que após este período o gel foi removido por aspiração com cânulas esterilizadas e a superfície dos discos foi lavada com 1 mL de água deionizada autoclavada com sucção concomitante. Três experimentos independentes foram realizados em momentos distintos para demonstrar a reprodutibilidade dos resultados.

Um novo experimento foi realizado, utilizando-se discos de esmalte/dentina, obtidos da mesma forma como descrito anteriormente. Entretanto o gel clareador foi aplicado por três vezes consecutivas, totalizando 45 minutos de contato do gel clareador com a superfície de esmalte dos discos. Após a terceira e última aplicação do gel clareador, este foi removido por sucção e a superfície lavada com água.

### 3.9 Obtenção dos extratos

Após a aplicação e remoção do agente clareador, o meio de cultura, o qual esteve em contato com a superfície de dentina do disco, foi recolhido, passando agora a ser denominado de extrato. Estes extratos, caracterizados por meio de cultura mais os componentes do gel clareador com capacidade de difusão através do esmalte e da dentina, foram aplicados diretamente sobre as células MDPC-23, previamente cultivadas em placas de 24 compartimentos. O extrato permaneceu em contato com as células pelo tempo de 1 hora em incubadora, na temperatura de 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de ar.

A identificação dos grupos experimentais, de acordo com as variáveis tratamento e tempo de armazenamento, está demonstrada nas Tabelas 1 e 2.

**Tabela 1-** Apresentação e identificação dos grupos de acordo com o tratamento e o tempo de armazenamento dos discos (1 aplicação do gel clareador)

Tratamento	Tempo de armazenamento		Total
	24 horas	6 meses	
Íntegros	n=13	n=13	26
Íntegros clareados	n=13	n=13	26
Restaurados	n=13	n=13	26
Restaurados clareados	n=13	n=13	26
Total	52	52	104

**Tabela 2-** Apresentação e identificação dos grupos de acordo com o tratamento e o tempo de armazenamento dos discos (3 aplicações do gel clareador)

Tratamento	Tempo de armazenamento		Total
	24 horas	6 meses	
Íntegros	n=18	n=9	27
Íntegros clareados	n=18	n=9	27
Restaurados	n=18	n=9	27
Restaurados clareados	n=18	n=9	27
Total	72	36	108

### **3.10 Avaliação do metabolismo celular (teste de MTT)**

A análise da atividade metabólica celular foi realizada por meio da demonstração citoquímica da desidrogenase succínica (SDH), a qual representa a taxa de respiração mitocondrial das células. Esse método é baseado na habilidade das mitocôndrias ativas de células vivas em converter o composto tetrazolium em um produto insolúvel. A enzima desidrogenase succínica das células viáveis quebra a estrutura do sal de tetrazolium, produzindo cristais de formazan de coloração azul. Assim, as diferentes tonalidades de azul são avaliadas em Leitor de Elisa<sup>66</sup>.

Decorrido o período de 1 hora após o contato das células com o extrato experimental, este extrato foi aspirado e uma solução contendo 900 µL de meio de cultura DMEM e 100 µL de solução de MTT (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA) na concentração de 5 mg/mL de PBS, foi aplicada em cada compartimento com a finalidade de identificar as células viáveis pela clivagem dos anéis de tetrazolium. As células imersas nesta solução foram incubadas por mais 4 horas a 37°C. Em seguida, o meio de cultura com a solução de MTT foi aspirado e cada compartimento recebeu 600 µL de solução de isopropanol acidificado em HCl a 0,04 N para solubilizar os cristais formados pela degradação dos anéis de tetrazolium. A coloração produzida foi quantificada, considerando-se que as células com atividade mitocondrial normal são coradas em azul intenso.

A viabilidade celular foi avaliada de maneira proporcional à absorbância determinada a 570 nm em leitor de ELISA (TP - Reader, ThermoPlate, China). Para tal finalidade, três alíquotas de 100 µL de cada compartimento foram removidas e colocadas em outra placa com 96 compartimentos (Costar Corp., Cambridge, MA, EUA). Para a padronização da leitura, os três primeiros compartimentos da placa foram preenchidos com 100 µL da solução de isopropanol acidificado em HCL a 0,04 N para se determinar o valor correspondente à passagem total da luz (branco), ou seja, ao valor máximo para a redução do metabolismo celular (0% de metabolismo). A leitura em espectrofotômetro foi realizada em triplicata para cada compartimento da placa de 24 compartimentos. Os resultados foram obtidos por meio da média em valores numéricos das alíquotas de cada compartimento.

### **3.11 Análise em microscopia eletrônica de varredura (MEV)**

Três compartimentos representativos dos grupos experimentais e controle foram destinados à avaliação da morfologia das células, utilizando-se, para isto, um microscópio eletrônico de varredura. Lamínulas de vidro com 13 mm de diâmetro, previamente esterilizadas, foram posicionadas no fundo dos compartimentos imediatamente antes do cultivo das células. Após o período de incubação das células em contato com os extratos, estes foram aspirados e as células MDPC-23 que permanecerem aderidas às lamínulas de vidro foram, então, fixadas por uma hora em 1 mL de glutaraldeído tamponado a 2,5%. Posteriormente à fixação inicial das células, estas foram submetidas aos seguintes procedimentos:

1. Lavagem por três vezes com 1 mL de PBS (5 minutos cada lavagem).
2. Pós-fixação em 200 µL de tetróxido de ósmio a 1% por 60 minutos.
3. Lavagem por duas vezes em 1 mL de PBS (5 minutos cada lavagem).
4. Lavagem por duas vezes em 1 mL de água destilada (15 minutos cada lavagem).
5. Desidratação em 1mL de solução de etanol 30%, 50% e 70%, 2x 95% e 2x 100% (30 minutos em cada solução).

6. Lavagem por três vezes com 200  $\mu$ L de 1,1,1,3,3,3,-Hexamethyldisilazane, 98% (HMDS, ACROS Organics, NY, EUA), 20 minutos cada lavagem.

Finalmente, a solução de HMDS foi desprezada, as lamínulas contendo as amostras foram removidas do fundo dos compartimentos, fixadas em stubs metálicos e mantidas em recipientes fechados por 12 horas em dessecador. Decorrido o tempo, os stubs contendo as lamínulas fixadas foram metalizados com ouro (BAL-TEC SCD 050, Balzers, Alemanha) e analisados em microscópio eletrônico de varredura (JEOL-JMS-T33A Scanning Microscope, JEOL Inc., Tóquio, Japão) para determinação da morfologia celular.

### **3.12 Tratamento estatístico dos dados**

Os dados de absorvância do teste de MTT foram primeiramente convertidos em porcentagem de acordo com a média de absorvância do grupo controle (discos íntegros não clareados armazenados por 24 horas), em cada momento dos experimentos (Anexo 1 e Anexo 2).

Para o experimento no qual o gel clareador foi aplicado somente uma vez, os dados em porcentagem com relação ao controle foram avaliados quanto à distribuição normal pelo teste de Kolmogorov-Smirnov e a homogeneidade de variâncias pelo teste de Levene. A distribuição dos dados foi considerada normal, portanto, a análise de variância a dois critérios fixos (tratamento e tempo de armazenamento) foi utilizada para a comparação dos grupos quanto ao metabolismo celular, complementado pelo teste de comparações múltiplas de Tukey.

Para o experimento no qual o gel clareador foi aplicado por três vezes consecutivas, a distribuição dos dados foi considerada não-normal (teste de Kolmogorov-Smirnov), portanto foram aplicados testes estatísticos não-paramétricos. Os testes de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney foram aplicados para a avaliação das variáveis tratamento e tempo de armazenamento, respectivamente.



Para avaliar o efeito da frequência de aplicação sobre o metabolismo celular os grupos foram comparados por testes de Mann-Whitney (1 aplicação vs. 3 aplicações). Todos os testes estatísticos foram considerados ao nível de significância de 5% ( $\alpha = 0,05$ ).

---

## *Resultado*

---



## 4 RESULTADO

### 4.1 Metabolismo celular (teste de MTT)

Para o experimento no qual o gel clareador foi aplicado somente uma vez, o metabolismo celular variou de 99,5% a 81,8%, com relação ao controle (Tabela 3). O fator tempo de armazenamento não exerceu efeito significativo e não foi observada interação entre os fatores tratamento e tempo de armazenamento (ANOVA,  $p > 0,05$ ). Apenas o fator tratamento exerceu efeito significativo entre os grupos. Portanto, foi realizada a análise de variância a um critério fixo para a variável tratamento, seguido do teste de comparações múltiplas de Tukey. Foi observada diferença estatisticamente significativa somente quando se comparou os discos íntegros não clareados com os discos restaurados clareados e os discos restaurados não clareados com os restaurados clareados (Tukey,  $p < 0,05$ ) (Tabela 3 e Figura 6).

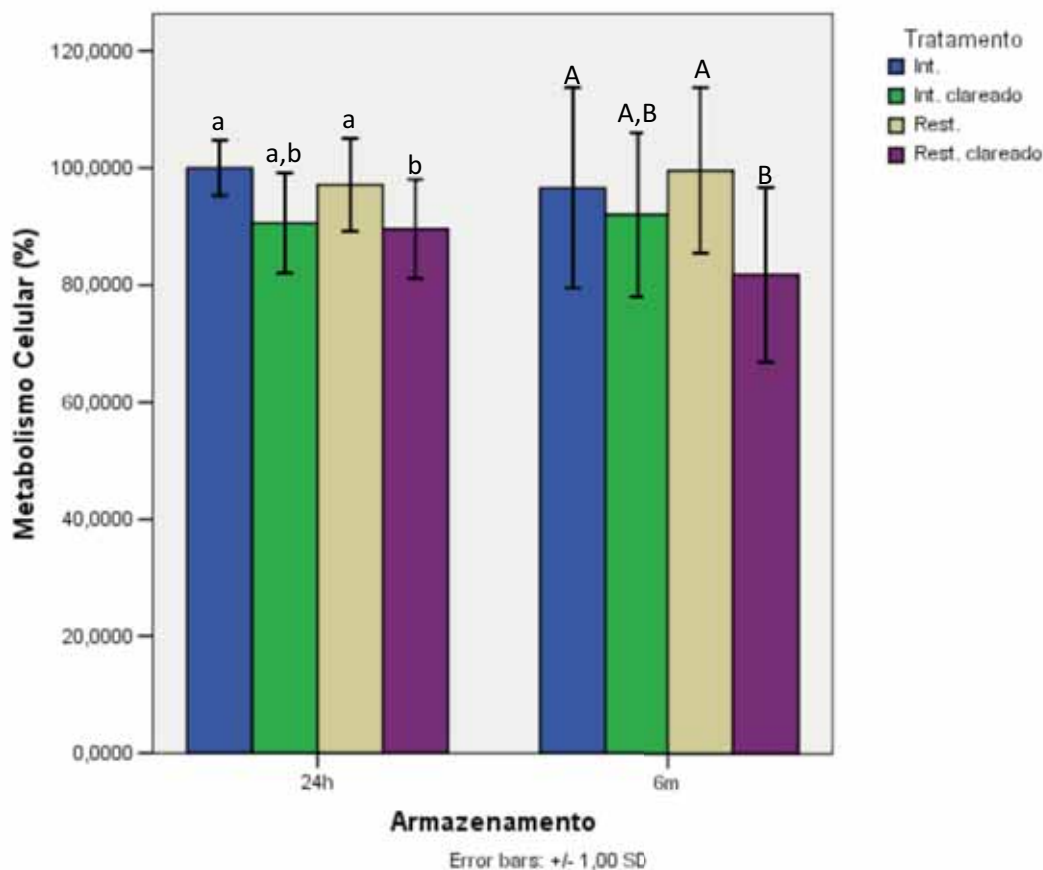
**Tabela 3-** Média dos valores em porcentagem do metabolismo celular para cada grupo (1 aplicação do gel clareador)

Tratamento	Armazenamento			
	24h	%***	6m	%***
Íntegros	100±4,7* <sup>A, a**</sup>	100,0	96,6±17,1 <sup>A, a</sup>	96,6
Íntegros clareados	90,6±8,6 <sup>AB, a</sup>	90,6	92,1±13 <sup>AB, a</sup>	92,1
Restaurados	97,1±7,9 <sup>A, a</sup>	97,1	99,5±14,1 <sup>A, a</sup>	99,5
Restaurados clareados	89,6±8,5 <sup>B, a</sup>	89,6	81,8±14,9 <sup>B, a</sup>	81,8

\* Valores representam média±desvio padrão.

\*\* Valores representados por letras iguais não diferem estatisticamente (Tukey,  $p > 0,05$ ). Letras maiúsculas: comparação entre as linhas. Letras minúsculas: comparação entre as colunas.

\*\*\* Porcentagem de metabolismo celular com relação ao controle (íntegros não clareados 24 horas).



**FIGURA 6-** Representação gráfica dos valores do metabolismo celular em porcentagem para cada grupo. Barras representam médias (n=10) e desvio padrão. Letras iguais indicam ausência de diferença estatisticamente significativa entre os grupos (Tukey,  $p > 0,05$ ). Letras minúsculas: comparação entre os grupos armazenados por 24 horas. Letras maiúsculas: comparação entre os grupos armazenados por 6 meses.

Para o experimento no qual o gel clareador foi aplicado por três vezes consecutivas, o metabolismo celular variou de 100,7% a 51,9%, com relação ao controle (Tabela 4). O fator tratamento exerceu efeito significativo sobre o metabolismo celular dos grupos e foi observada interação entre os fatores (tratamento vs. tempo de armazenamento). Sempre que o agente clareador foi aplicado, houve redução significativa do metabolismo celular quando comparado ao grupo não clareado (Mann-Whitney,  $p < 0,05$ ). Entre os grupos clareados não houve diferença com relação à presença de restauração e o tempo de armazenamento (Tabela 4 e Figura 7).

A presença da restauração gerou um aumento do metabolismo celular quando comparado ao grupo controle, sem a aplicação do agente clareador

(íntegros vs. restaurados). Esse aumento do metabolismo foi estatisticamente significativo somente para os grupos que foram armazenados por 24 horas (Tabela 4 e Figura 7).

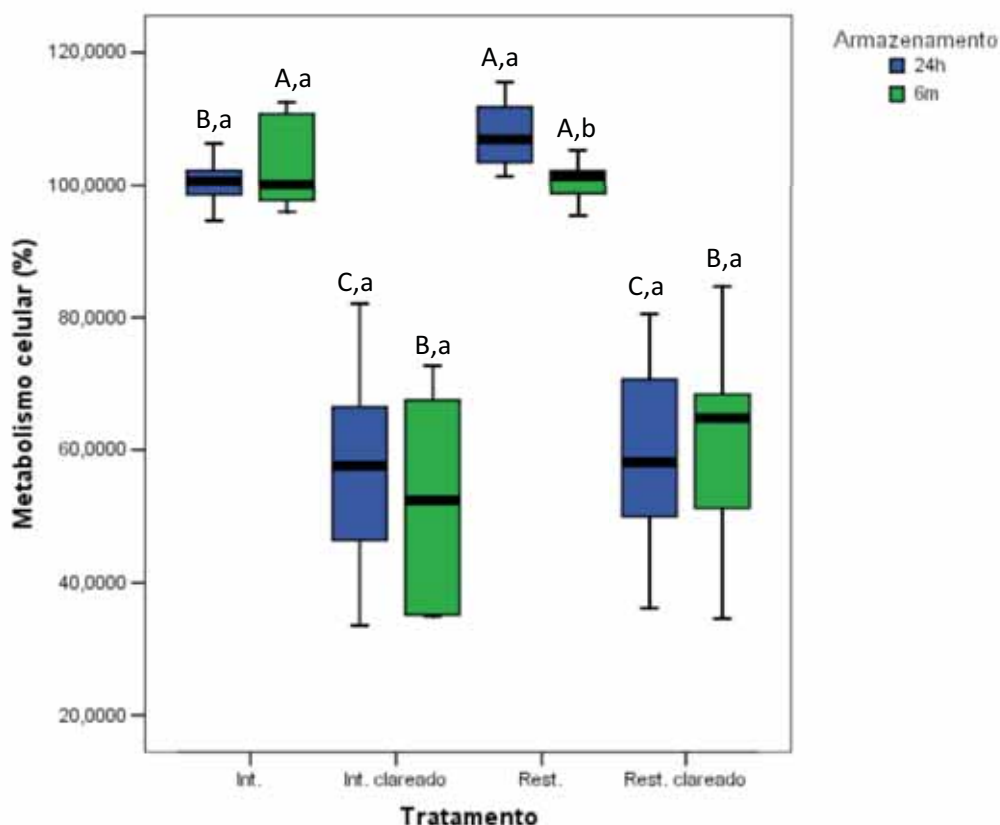
**Tabela 4-** Mediana dos valores em porcentagem do metabolismo celular para cada grupo (3 aplicações do gel clareador)

Tratamento	Armazenamento			
	24h	%***	6m	%***
Íntegros	100,7 (98,3/102,5)* B,a**	100,0	100,2 (97,3/111,3) A,a	99,5
Íntegros clareados	57,5 (41,2/68,9) C,a	57,1	52,3 (35,1/68,8) B,a	51,9
Restaurados	107 (103,5/112,1) A,a	106,3	101,4 (97,1/103,8) A,b	100,7
Restaurados clareados	58 (49,2/70,6) C,a	57,6	64,7 (47/72,4) B,a	64,3

\* Valores representam mediana (P25/P75).

\*\* Valores representados por letras iguais não diferem estatisticamente (Mann-Whitney,  $p > 0,05$ ). Letras maiúsculas: comparação entre as linhas. Letras minúsculas: comparação entre as colunas.

\*\*\* Porcentagem de metabolismo celular com relação ao controle (íntegros não clareados 24 horas).



**FIGURA 7-** Box-whisker plot dos valores do metabolismo celular em porcentagem para cada grupo. Grupos identificados com a mesma letra não diferem estatisticamente (Mann-Whitney,  $p > 0,05$ ). Letras maiúsculas: comparação entre os tratamentos, dentro do mesmo tempo de armazenamento. Letras minúsculas: comparação entre o tempo de armazenamento, dentro do mesmo tratamento.

A avaliação do efeito da frequência de aplicação do gel clareador sobre o metabolismo celular demonstrou que o tempo de armazenamento não exerceu efeito significativo quando a análise estatística foi realizada agrupando-se os experimentos (1 aplicação e 3 aplicações). Entretanto, foram detectadas diferenças estatisticamente significantes quando se comparou o número de aplicações do gel clareador. Para ambos os tempos de armazenamento (24 horas e 6 meses), nos grupos clareados (íntegros clareados e restaurados clareados), quando o gel clareador foi aplicado por três vezes consecutivas houve diminuição do metabolismo estatisticamente significativa quando comparado aos grupos que receberam somente uma aplicação do gel clareador (Tabela 5, Figuras 8 e 9).

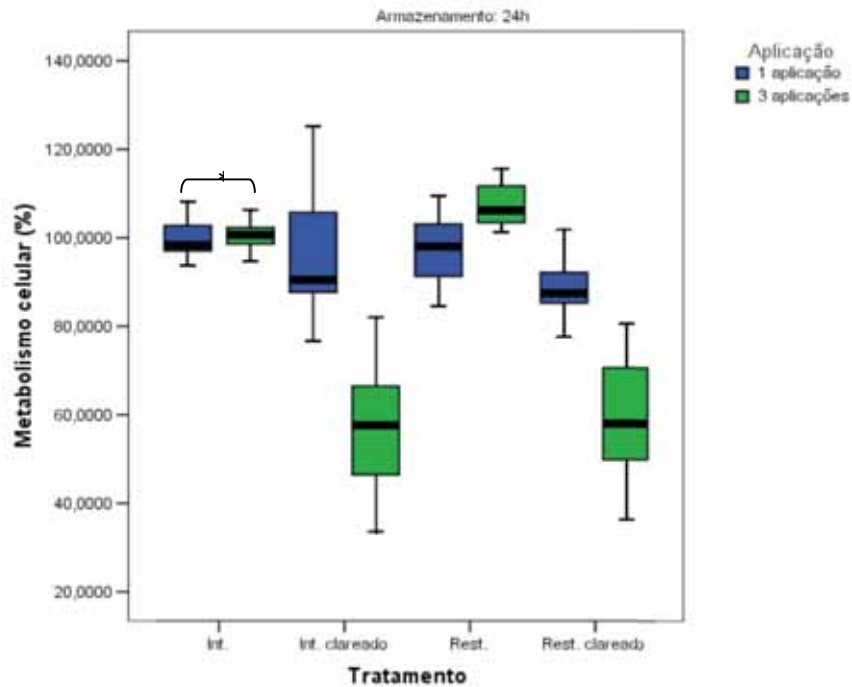
**Tabela 5-** Mediana dos valores em porcentagem do metabolismo celular para cada grupo (1 aplicação vs. 3 aplicações)

Tratamento	Armazenamento	Aplicações		Significância**
		1 aplicação	3 aplicações	
Íntegros		98,4 (96,6/103,6)*	100,7 (98,3/102,5)	N.S.
Íntegros clareados	24 horas	90,5 (87,4/110,6)	57,5 (41,2/68,9)	S
Restaurados		98,1 (90/103,3)	107 (103,5/112,1)	S
Restaurados clareados		87,4 (84,8/94,6)	58 (49,2/70,6)	S
Íntegros			97,8 (82,7/112,9)	100,2 (97,3/111,3)
Íntegros clareados	6 meses	88,2 (84,8/92,8)	52,3 (35,1/68,8)	S
Restaurados		95,5 (90,7/116,5)	101,4 (97,1/103,8)	N.S.
Restaurados clareados		80,4 (76,2/101,7)	64,7 (47/72,4)	S

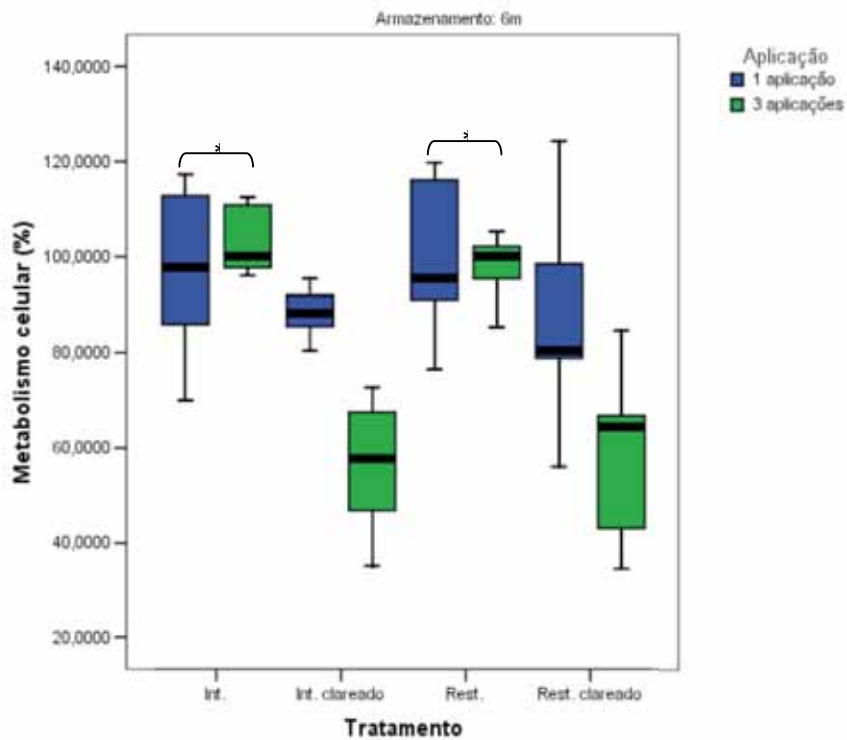
\* Valores representam mediana (P25/P75)

\*\* S- Valores com diferença estatisticamente significativa (Mann-Whitney,  $p < 0,05$ ).

N.S.- Valores sem diferença estatisticamente significativa (Mann-Whitney,  $p > 0,05$ ).



**FIGURA 8-** Box-whisker plot dos valores do metabolismo celular em porcentagem para os grupos com tempo de armazenamento de 24 horas. \* Grupos conectados por uma linha horizontal não diferem estatisticamente (Mann-Whitney,  $p > 0,05$ ).



**FIGURA 9-** Box-whisker plot dos valores do metabolismo celular em porcentagem para os grupos com tempo de armazenamento de 6 meses. \* Grupos conectados por uma linha horizontal não diferem estatisticamente (Mann-Whitney,  $p > 0,05$ ).

#### **4.2 Análise da morfologia celular (MEV)**

Para o experimento no qual o gel clareador foi aplicado somente uma vez, foram observadas alterações na morfologia das células, as quais se apresentavam mais arredondadas. Notou-se também uma redução no número de células aderidas ao substrato de vidro, evidenciando a ocorrência de lesão e morte celular (Figura 10). Essas alterações foram mais evidentes nos grupos restaurados com resina composta, principalmente naquele grupo onde os discos submetidos ao envelhecimento (Figuras 10F e 10H).

Nos grupos não clareados, observou-se um grande número de células odontoblastóides MDC-23 próximo da confluência. Estas células estavam recobrimo toda a superfície do substrato de vidro através de seu amplo citoplasma. Além disso, foram observadas células em processo de mitose, demonstrando a presença de proliferação celular (Figuras 10A, 10C, 10E e 10G).

Para o experimento no qual o gel clareador foi aplicado por três vezes consecutivas, as células que não foram submetidas ao contato com extratos provenientes dos procedimentos clareadores apresentaram morfologia dentro da normalidade. Por outro lado, tal como anteriormente descrito para o experimento de aplicação única do gel clareador (15 minutos), nos grupos de 3 aplicações consecutivas observou-se alterações morfológicas nas células pulpares em cultura. Entretanto, essas alterações na morfologia e número de células aderidas ao substrato foi mais evidente para este segundo experimento (Figura 11). De uma maneira geral, para todos os grupos clareados por 45 minutos, ocorreram alterações celulares semelhantes, independente da presença ou não da restauração e do tempo de armazenamento. As poucas células que permaneceram aderidas ao substrato de vidro apresentaram morfologia arredondada e amplas áreas vazias da lamínula de vidro foram observadas, caracterizando a ocorrência de lesão e morte celular (Figuras 11B, 11D, 11F e 11H).

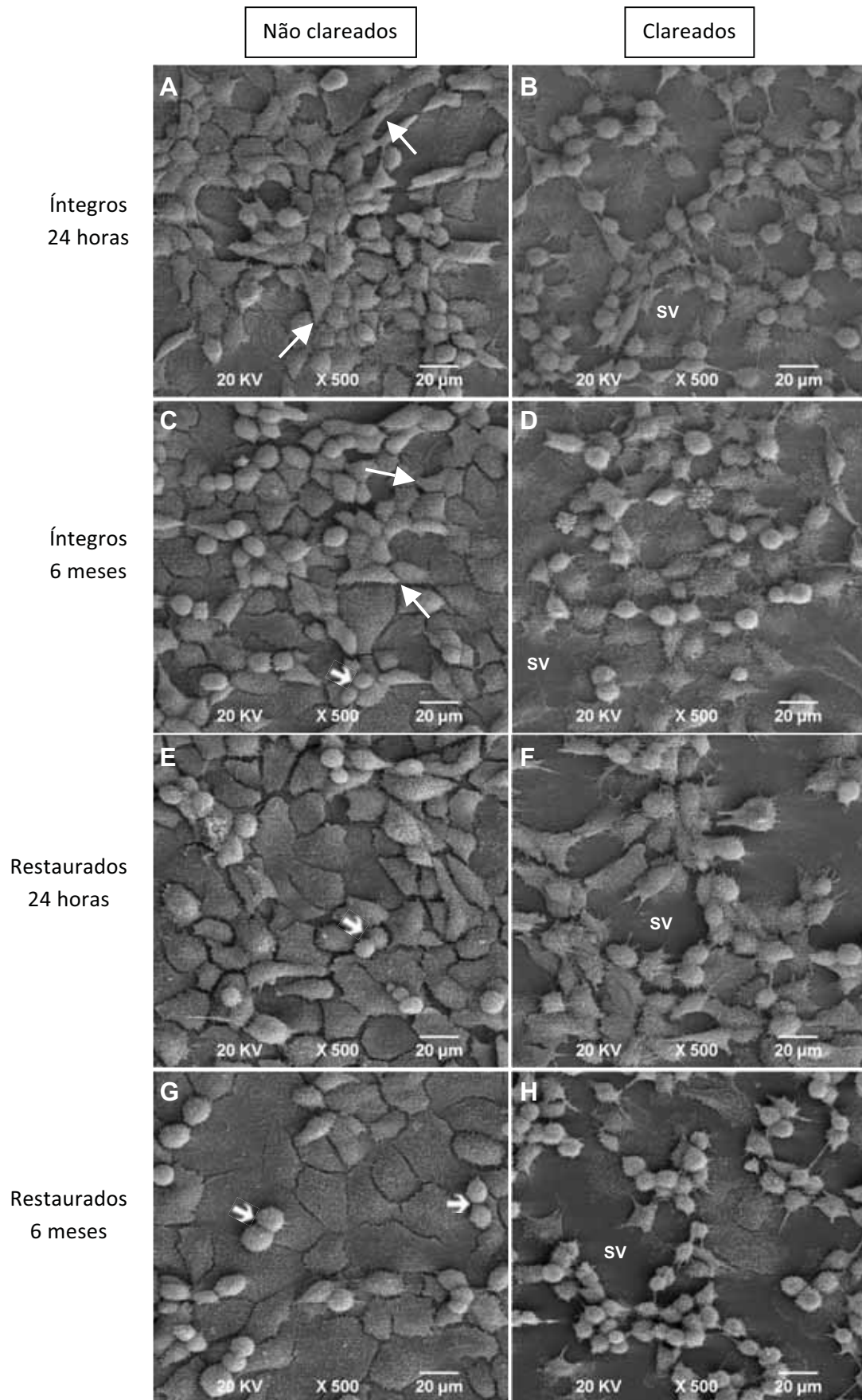


**FIGURA 10-** Fotomicrografias representativas da morfologia celular dos grupos nos quais o gel clareador foi aplicado somente uma vez.

**A, C, E e G – grupos não clareados (íntegro 24 horas, íntegro 6 meses, restaurado 24 horas e restaurado 6 meses, respectivamente):** Em todos os grupos foram observadas características morfológicas de normalidade. Um grande número de células MDPC-23 em confluência pode ser observado sobre o substrato de vidro. Estas células exibem amplo citoplasma, o que faz com que elas recubram toda a lamínula de vidro sobre a qual foram cultivadas. Note os numerosos prolongamentos citoplasmáticos originados de sua membrana (→) e a ocorrência de mitoses celulares (→). MEV, 500X.

**B e D (íntegro 24 horas clareado e íntegro 6 meses clareado, respectivamente):** Ambos os grupos apresentaram características morfológicas semelhantes. As células que permaneceram aderidas ao substrato de vidro exibem morfologia alterada, caracterizada por contração de citoesqueleto, o que resultou na redução de tamanho de cada célula individualmente. Esta redução no tamanho celular causou a exposição de pequenas áreas do substrato (**SV**). MEV, 500X.

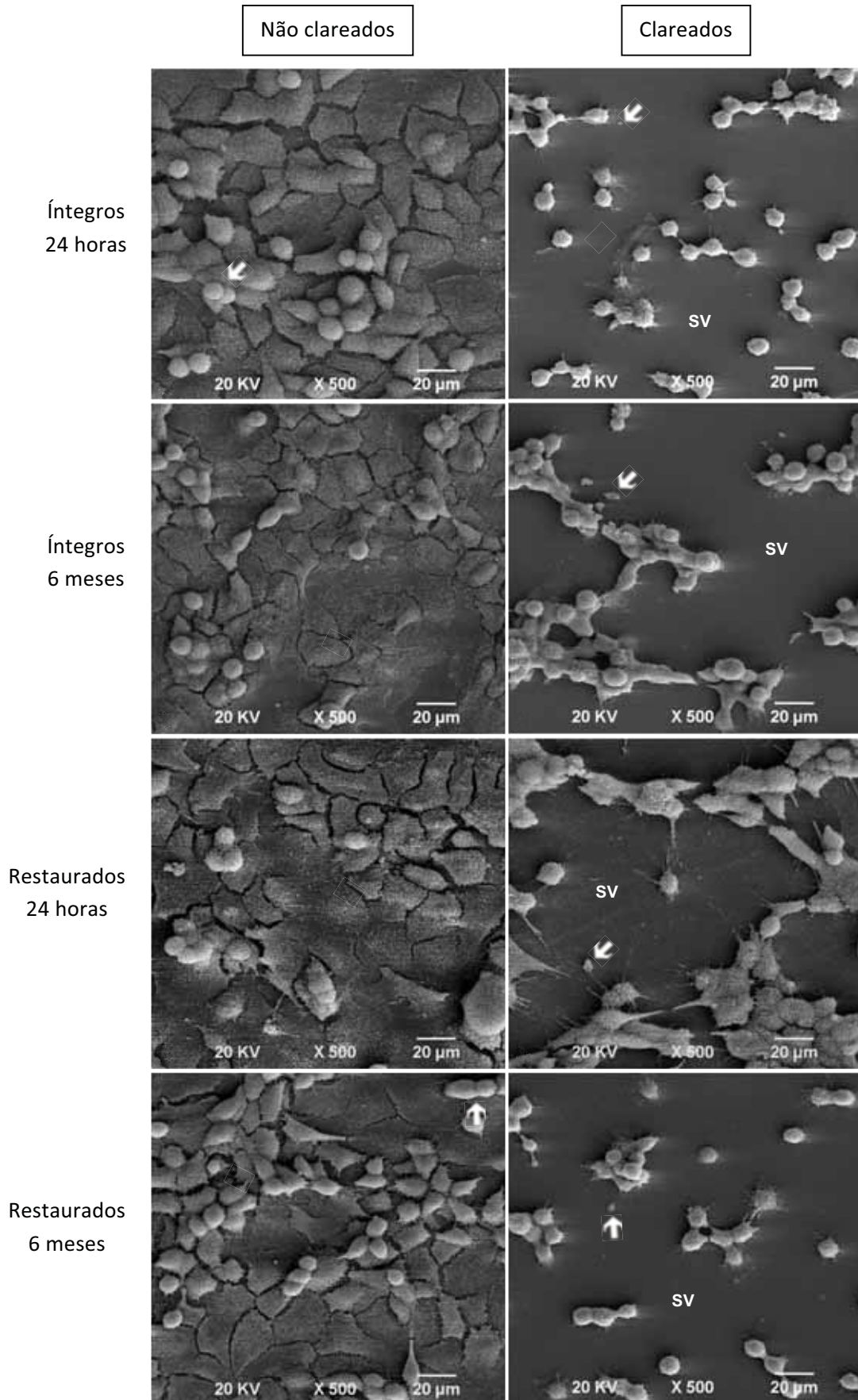
**F e H (restaurado 24 horas clareado e restaurado 6 meses clareado, respectivamente):** As alterações morfológicas observadas para ambos os grupos foram mais acentuadas quando comparadas aos grupos íntegros. As células exibem uma contração do citoesqueleto mais pronunciada conferindo aspecto arredondado à morfologia celular e áreas mais amplas do substrato de vidro (**SV**) podem ser visualizadas. Além disso, para o grupo armazenado por 6 meses (**H**), observa-se que a maior parte das células apresenta-se com morfologia arredondada e as imagens sugerem uma redução do número de células, as quais se desprenderam do substrato de vidro expondo áreas vazias ainda maiores (**SV**). MEV, 500X.



**FIGURA 11-** Fotomicrografias representativas da morfologia celular dos grupos nos quais o gel clareador foi aplicado por três vezes consecutivas.

**A, C, E e G – grupos não clareados (íntegro 24 horas, íntegro 6 meses, restaurado 24 horas e restaurado 6 meses, respectivamente):** Em todos os grupos as células exibem morfologia dentro da normalidade e estão próximas da confluência, apresentado amplo citoplasma com numerosos prolongamentos citoplasmáticos e presença de mitoses (→). MEV, 500X.

**B, D, F e G - grupos clareados (íntegro 24 horas, íntegro 6 meses, restaurado 24 horas e restaurado 6 meses, respectivamente):** O agente clareador aplicado por três vezes consecutivas causou intensas alterações morfológicas nas células MDPC-23 além de promover morte celular. Note que amplas áreas do substrato de vidro (**SV**) estão expostas indicando que as células pulpareas foram letalmente agredidas e se desprenderam permanecendo somente restos celulares (→) sobre a lamínula de vidro. As poucas células que permaneceram aderidas exibem morfologia arredondada e notável redução de tamanho, caracterizada pela acentuada contração do citoesqueleto. MEV, 500X.



---

## *Discussão*

---



## 5 DISCUSSÃO

A busca pelo sorriso perfeito e por dentes cada vez mais brancos se tornou muito comum na sociedade contemporânea. Desta maneira, o clareamento dentário é um dos procedimentos estéticos mais procurados nos consultórios odontológicos, sendo considerada uma técnica não invasiva por não envolver desgastes mecânicos da superfície dentária<sup>24,46,97</sup>. Entretanto tem sido demonstrado que a aplicação do gel clareador sobre o esmalte pode resultar na formação de porosidades devido à dissolução da matriz deste tecido altamente mineralizado<sup>13,51</sup>, aumentando sua permeabilidade<sup>76</sup>. Tais porosidades podem propiciar uma maior penetração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e componentes derivados dos agentes clareadores em direção à polpa.

Diversas pesquisas in vitro demonstraram que o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> presente nos agentes clareadores, mesmo em baixas concentrações, atravessa facilmente o esmalte e a dentina e atinge a câmara pulpar<sup>34,36,39,75</sup>. Quando em contato com o tecido pulpar o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e os produtos resultantes de sua degradação, tais como íons hidroxila (OH<sup>-</sup>) e outras espécies reativas de oxigênio, podem causar peroxidação lipídica e fragmentação de proteínas com conseqüente lesão da membrana celular<sup>59</sup>, gerando morte celular por apoptose ou necrose<sup>31,73</sup>. Benetti et al.<sup>7</sup>, em 2004, avaliaram a capacidade de difusão in vitro do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> através dos tecidos duros de dentes bovinos, utilizando géis clareadores com 35% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na sua composição. Os autores demonstraram que uma elevada concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se difundiu através do esmalte e da dentina em direção ao espaço pulpar. Entretanto, o trabalho não determinou se os elevados níveis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> detectados no interior das câmaras pulpares influenciariam, de maneira significativa, a toxicidade da técnica de clareamento. Para elucidar tal questão, pesquisas de citotoxicidade, também utilizando incisivos bovinos íntegros, foram realizadas aplicando-se altas concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (20-38%) sobre discos de esmalte e dentina<sup>18,27,72,91</sup>. Os autores constataram que componentes do agente clareador foram capazes de atravessar a estruturadentária para causar intensos efeitos tóxicos sobre as células pulpares MDPC-23 em cultura. Estes autores demonstraram ainda que o número de aplicação do gel clareador sobre o esmalte está diretamente relacionado

com a intensidade dos efeitos tóxicos dos produtos para as células pulpares, sendo que este dado torna preocupante o uso indiscriminado do clareamento dentário. Semelhante metodologia também foi utilizada na presente pesquisa *in vitro*, onde foram confeccionados discos de esmalte/dentina, obtidos a partir de dentes bovinos, os quais foram adaptados em câmaras pulpares artificiais. Dentes bovinos foram selecionados por apresentarem características semelhantes aos dentes humanos, como número e diâmetro dos túbulos dentinários e radiopacidade do esmalte e da dentina<sup>7,14,76</sup>, sendo também considerados substitutos adequados para trabalhos de adesão com molares humanos<sup>76</sup>. É importante ressaltar também que a espessura dos discos de esmalte/dentina foi padronizada em 3,5 mm (1,3 mm de esmalte e 2,2 mm de dentina), semelhante àquela descrita por Sulieman et al.<sup>82</sup> (2005) para dentes humanos (de 0,9 à 1,05 mm de esmalte e 2,33 mm de dentina). Procurou-se simular, dessa maneira, uma situação *in vivo* semelhante àquelas onde os agentes clareadores são aplicados sobre os dentes com o objetivo principal de clareá-los.

As células MDPC-23 utilizadas na presente pesquisa foram estabelecidas por Hanks et al.<sup>40</sup>, em 1998. Estas células odontoblastóides de linhagem imortalizada, isoladas da papila dentária de molar de camundongos (Mouse Dental Papillae Cells), apresentam características fenotípicas semelhantes aos odontoblastos, tais como alta atividade de fosfatase alcalina, organização em nódulos epitelióides e definida expressão de sialoproteína e fosfoforina da dentina<sup>40</sup>. Assim, tem sido relatado que os odontoblastos são as células mais apropriadas para se avaliar, *in vitro*, os efeitos adversos de materiais dentários e/ou seus componentes isolados. Isto porque estas células típicas da polpa revestem internamente toda dentina coronária e radicular, e sendo assim, são as primeiras células pulpares a serem afetadas por produtos ou resíduos de materiais capazes de se difundir através dos tecidos duros do dente<sup>37</sup>. Desta maneira, células com fenótipo de odontoblasto tem sido alvo de intensas pesquisas para avaliar a citotoxicidade de diferentes materiais odontológicos<sup>5,18,21,27,41,72,80,91</sup>, tal como ocorrido na presente investigação.

Com relação ao procedimento clareador, na presente pesquisa não foi utilizado qualquer tipo de fonte de luz associada ao agente clareador. De acordo com a literatura a luz tem um efeito catalisador, pois acelera a liberação de radicais hidroxilas ( $\text{OH}^-$ ) a partir do  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Quando a luz é aplicada sobre o gel clareador, uma parte dela é absorvida e sua energia é convertida em calor, o qual é utilizado para quebrar o  $\text{H}_2\text{O}_2$  e liberar os radicais  $\text{OH}^-$  para interagir com moléculas mais complexas e degradá-las no interior do tecido dentário<sup>13</sup>. Todavia, a aplicação de luz pode gerar tanto um aumento de temperatura<sup>96</sup> quanto uma maior difusão do agente clareador e/ou seus produtos através dos tecidos duros do dente para o interior da câmara pulpar<sup>43</sup>, podendo tornar o procedimento clareador ainda mais agressivo para a polpa dentária. Dias Ribeiro et al.<sup>27</sup>, em 2009, demonstraram que a aplicação de luz halógena tornou a técnica de clareamento dentário com 35% de  $\text{H}_2\text{O}_2$  mais tóxica para as células pulpares. Além disso, pesquisas recentes têm fornecido evidências de que a catalisação dos géis clareadores por meio da utilização de fontes de luz não é necessária para se obter melhores resultados estéticos, ou seja, a aplicação da luz não traz contribuição comprovada no resultado final do clareamento dentário<sup>12,43,56</sup> e ainda pode causar danos ao tecido pulpar<sup>13</sup>.

Tem sido observado que os dados obtidos a partir dos estudos in vitro nem sempre correspondem ao que é visto in vivo, devido à dificuldade de simular, em nível laboratorial, todas as condições fisiológicas do complexo dentino-pulpar. A pressão de exsudação do fluido dentinário, bem como a presença de prolongamentos citoplasmáticos e outros componentes intratubulares nos dentes vitais<sup>74</sup> podem diminuir a difusão de componentes do gel clareador através dos túbulos dentinários. Além disso, a polpa dentária apresenta um sistema de vasos linfáticos que participa da eliminação de produtos externos que alcançam este tecido conjuntivo especializado. Outro fator importante é a presença de enzimas anti-oxidantes, tais como catalase, superóxido dismutase, peroxidases além das vitaminas A e E e do ácido ascórbico que atuam na degradação enzimática do  $\text{H}_2\text{O}_2$ <sup>10,29</sup>. Poucos estudos in vivo avaliaram a resposta pulpar frente aos diversos tipos de clareamento disponíveis. Seale e Wilson<sup>78</sup> (1985) avaliaram a resposta pulpar de dentes



clareados com gel contendo  $H_2O_2$  a 35%. Os autores constataram resposta inflamatória pulpar considerável, porém a pesquisa foi realizada em dentes de cães, podendo haver variação com relação à espessura de esmalte/dentina quando comparado a dentes humanos. Pesquisas realizadas em dentes humanos posteriores demonstraram que agentes clareadores contendo 35% e 38% de  $H_2O_2$  não causaram dano pulpar significativo<sup>17,49</sup>. Entretanto, numa pesquisa recente, onde um gel clareador com 38% foi aplicado sobre o esmalte de dentes anteriores, foi relatada a ocorrência de ampla área de necrose da polpa coronária e degradação significativa da polpa radicular<sup>26</sup>. Os autores descreveram que o procedimento clínico de clarear dentes anteriores (incisivos) em consultório, utilizando géis com alta concentração de  $H_2O_2$ , pode causar não apenas danos pulpares, mas também dor pós-operatória. Este estudo pioneiro foi o primeiro realizado com incisivos humanos, pois até o momento, só haviam sido publicadas investigações avaliando os efeitos dos agentes clareadores em dentes posteriores, especialmente pré-molares, os quais apresentam maior espessura de esmalte e dentina. Assim, esta maior espessura dos tecidos duros dos dentes posteriores quando comparado aos anteriores poderia mascarar os efeitos tóxicos dos procedimentos clareadores, já que o foco principal do clareamento dentário está centrado nos dentes anteriores, os quais possuem reduzida espessura de esmalte/dentina. Portanto, a literatura comprova, tanto com trabalhos *in vitro* quanto *in vivo*, que os procedimentos de clareamento dentário podem resultar em efeitos tóxicos para as células e tecido pulpar como um todo, o que causaria desde processos inflamatórios discretos e reversíveis até necrose da polpa.

Diante da comprovada toxicidade dos componentes provenientes de agentes clareadores que se difundem para o tecido pulpar, os fatores que influenciam a penetração do  $H_2O_2$  devem ser considerados, tais como concentração do agente clareador<sup>9,19</sup>, tempo de contato com a superfície dental<sup>39</sup>, forma de apresentação (peróxido de carbamida, perborato de sódio ou  $H_2O_2$ )<sup>19,35</sup>, espessura de esmalte e dentina do dente submetido ao clareamento<sup>15</sup> e utilização de calor ou luz<sup>9,15</sup>. Outro fator muito importante a ser considerado é a presença de restaurações na superfície a ser clareada.

Estudos *in vitro* de quantificação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na câmara pulpar de dentes humanos e bovinos demonstram que ocorre maior penetração de peróxido em dentes restaurados quando comparados aos dentes íntegros, devido à presença de uma interface dente/restauração<sup>7,14,33,36</sup>. De acordo com Gökay et al.<sup>36</sup> (2000) e Camargo et al.<sup>14</sup> (2007), as restaurações de resina composta apresentam menores valores de penetração de peróxido quando comparados a dentes restaurados com cimento de ionômero de vidro e compômeros. Esta menor penetração pode ocorrer devido à obtenção de melhor selamento marginal quando se utiliza resina composta; entretanto nenhum material restaurador é capaz de promover um perfeito selamento marginal das restaurações<sup>69</sup> e mesmo dentes restaurados com resina composta apresentam níveis de penetração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> significativamente maiores quando comparados aos dentes sem restauração<sup>7,14,33,36</sup>. Portanto, um dos objetivos da presente pesquisa foi avaliar se a presença de restaurações de resina composta possui influência sobre a citotoxicidade do agente clareador. Além disso, as restaurações de resina composta sofrem degradação da interface adesiva ao longo do tempo<sup>25</sup>, o que poderia favorecer ainda mais a penetração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em direção à polpa. Por esse motivo, uma parte dos discos restaurados foi submetida a procedimentos de envelhecimento *in vitro* da interface adesiva (armazenamento em água por 6 meses associado à termociclagem). O procedimento de armazenamento em solução aquosa é o método de envelhecimento da restauração mais comumente utilizado, sendo empregado diversos tempos de armazenamento, variando de 6 meses até 4 anos<sup>4</sup>. No presente estudo, o tempo de armazenamento selecionado foi de 6 meses, com trocas diárias da solução aquosa, o que acelera a degradação da interface adesiva<sup>50</sup>. Tem sido relatado que a termociclagem simula as mudanças térmicas que ocorrem na cavidade bucal por meio de repetidos ciclos térmicos que induzem estresse de contração/expansão criando microfendas que permitem a passagem de fluidos, os quais podem favorecer a degradação hidrolítica da interface adesiva<sup>4</sup>. O número de ciclos empregado possui uma grande variação, desde 500 ciclos a até mais de 50.000 ciclos. A ISO<sup>45</sup> preconiza a utilização de somente 500 ciclos para simular o envelhecimento de

restaurações adesivas. Entretanto, alguns estudos consideram esse número insuficiente para simular mudanças à longo prazo na durabilidade adesiva<sup>32,64,68</sup>. Portanto, na presente pesquisa, foram realizados 20.000 ciclos para o procedimento de termociclagem, o que representa, aproximadamente, dois anos de função clínica<sup>32</sup>.

No experimento no qual o gel clareador foi aplicado somente uma vez sobre o esmalte, não houve diferença com relação ao metabolismo celular quando os discos foram submetidos ao procedimento de envelhecimento das restaurações *in vitro* por 6 meses em comparação aos dentes armazenados por 24 horas (Tabela 3 e Figura 6). Os discos íntegros (sem restauração) não promoveram diminuição significativa do metabolismo celular quando foram clareados por apenas 15 minutos. Entretanto, a presença da restauração de resina composta favoreceu a citotoxicidade do procedimento clareador, tornando a diminuição do metabolismo celular significativa com relação ao controle (dentes íntegros 24 horas não clareados) e com relação ao grupo restaurado e não clareado. As alterações celulares causadas pelo agente clareador foram mais acentuadas nos grupos restaurados, independente do tempo de armazenamento (Figura 10). Portanto, a presença da restauração tornou o procedimento clareador ligeiramente mais citotóxico, promovendo, agora, diferenças estatisticamente significantes quanto ao metabolismo celular. Nos estudos que avaliaram a penetração *in vitro* de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por meio de método de quantificação em tampão acetato, a presença da restauração de resina composta promoveu a penetração de quantidades estatisticamente maiores de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para o interior da câmara pulpar, tanto em dentes humanos<sup>15,33,36</sup> quanto em dentes bovinos<sup>7</sup>. Entretanto, Camargo et al.<sup>14</sup> (2007) observaram diferenças entre dentes humanos e bovinos. Os dentes humanos foram mais permeáveis quando comparados aos dentes bovinos e apresentaram os maiores níveis de penetração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para o interior da câmara pulpar. Os autores observaram diferenças estatisticamente significantes de penetração dos componentes do gel clareador nas estruturas dentárias somente para os dentes humanos restaurados e justificaram tais variações pela diferença de espessura entre os dentes humanos e bovinos. Os dentes bovinos apresentavam maior espessura

de esmalte e dentina quando comparados aos dentes humanos. Todavia, no presente estudo, buscou-se padronizar a espessura de todos os discos, reduzindo, desta maneira, a possível interferência das características do esmalte e dentina no resultados dos experimentos. Com base nestes estudos, pode-se especular que houve maior penetração de  $H_2O_2$  quando se aplicou o agente clareador sobre os discos restaurados com resina composta, o que aumentou ligeiramente a citotoxicidade do clareamento com uma aplicação do gel. Entretanto, durante a técnica de clareamento dentário de consultório, muitas vezes uma única aplicação do agente clareador não é suficiente para atingir o resultado estético desejado, sendo necessária a aplicação do gel clareador por várias vezes em uma única sessão<sup>13</sup>. De acordo com as normas do fabricante do agente clareador utilizado na presente pesquisa (Whiteness HP, FGM), o gel pode ser aplicado por até três vezes consecutivas, de 15 minutos cada aplicação, por sessão. Portanto, no protocolo de pesquisa estabelecido para este estudo, foi realizada, também, a aplicação do agente clareador por três vezes consecutivas sobre a estrutura dentária. Nesse caso, toda vez que o procedimento clareador foi realizado sobre os discos de esmalte/dentina, houve diminuição significativa do metabolismo celular (em torno de 40% de redução) com relação aos grupos não clareados (Tabela 4 e Figura 7). Estes resultados estão de acordo com Trindade et al.<sup>91</sup> (2009), os quais também observaram queda significativa de metabolismo celular utilizando metodologia semelhante e aplicando o mesmo gel clareador por três vezes consecutivas, totalizando um tempo de contato de 45 minutos do gel clareador com a superfície de esmalte dos discos. De forma semelhante ao que ocorreu quando o gel foi aplicado somente uma vez sobre o esmalte, não foram observadas influências no metabolismo celular quando as restaurações foram envelhecidas e submetidas ao clareamento, ou seja, o tempo de armazenamento e termociclagem também não exerceram efeito significativo na citotoxicidade do clareamento dentário. Com relação à influência da restauração, não foram observadas diferenças de metabolismo celular quando comparado aos discos íntegros. Diante de maiores níveis de citotoxicidade devido à aplicação do gel clareador por repetidas vezes, a presença da

restauração não promoveu diferença quanto aos efeitos tóxicos. Este fato pode ser observado também pela análise da morfologia das células (Figura 11). De maneira geral, o procedimento clareador repetido por três vezes promoveu severas alterações em todos os grupos clareados.

Um achado interessante no presente estudo foi observado nos grupos restaurados. A presença da restauração de resina composta gerou um aumento do metabolismo celular quando comparado ao grupo controle, sem a aplicação do agente clareador. Esse aumento do metabolismo foi estatisticamente significativo somente para o grupo que foi armazenado por 24 horas. A literatura comprova que o substrato dentinário possui metaloproteinases aprisionadas dentro de sua matriz dentinária<sup>60,83,84</sup>. Estas metaloproteinases são liberadas e ativadas durante a desmineralização da dentina, podendo promover a degradação da interface adesiva de restaurações de resina composta<sup>70</sup>. Entretanto, especula-se também que alguns procedimentos restauradores podem liberar grande quantidade de moléculas potencialmente bioativas<sup>30</sup>. Tomson et al.<sup>89</sup> (2007) comprovaram que o cimento de hidróxido de cálcio e o MTA são capazes de extrair TGF- $\beta$ 1 (fator de crescimento relacionado com a diferenciação celular) da dentina. Esses materiais odontológicos, quando em contato com a dentina, são capazes de liberar moléculas bioativas da dentina devido ao seu pH, tal como ocorre em situações de condicionamento ácido da dentina ou no processo de evolução das lesões de cárie dentária<sup>38</sup>. De acordo com Ferracane et al.<sup>30</sup> (2010), os fatores de crescimento e outras moléculas bioativas liberados da dentina podem ter papel importante na sinalização celular durante a exposição do tecido pulpar ao hidróxido de cálcio, por exemplo, agindo no recrutamento de células indiferenciadas da polpa para o local de injúria. Foi comprovado também que os adesivos autocondicionantes possuem a capacidade de liberar essas importantes moléculas bioativas a partir da dentina<sup>85</sup>. Portanto, com base nesses trabalhos, pode-se especular que o procedimento restaurador utilizado na presente pesquisa possa ter liberado moléculas bioativas presentes na dentina, estimulando, dessa maneira, as células odontoblastóides MDPC-23 a aumentarem seu metabolismo celular. No grupo armazenado por 6 meses não

houve aumento do metabolismo celular frente à presença da restauração, talvez porque as sucessivas trocas da solução aquosa tenham removido possíveis moléculas bioativas liberadas da dentina no meio. Por outro lado, pode-se também especular que as células pulpares tiveram aumento do metabolismo celular estimuladas por baixas concentrações de monômeros resinosos, como o HEMA. Mantellini et al.<sup>58</sup>, em 2006, comprovaram que as células MDPC-23, quando expostas ao HEMA, apresentaram aumento da expressão de VEGF (fator de crescimento vascular endotelial). Os autores utilizaram o adesivo Single Bond (3M ESPE) e não observaram morte celular quando o adesivo foi adequadamente polimerizado.

O fato dos procedimentos de envelhecimento *in vitro* (armazenamento 6 meses + termociclagem) não exercerem efeito significativo na citotoxicidade do procedimento clareador para ambos os experimentos (1 aplicação e 3 aplicações) não determina que o envelhecimento da restauração não tenha sido efetivo, pois, de acordo com Lima et al.<sup>57</sup> (2010), a utilização de somente 1.000 ciclos térmicos associada ao armazenamento em solução aquosa por 6 meses foi suficiente para aumentar significativamente a infiltração marginal de restaurações de resina composta. Na presente pesquisa, foram realizados 20.000 ciclos térmicos, o que provavelmente resultou no surgimento de alterações nas margens das restaurações pelo estresse de contração e expansão; entretanto, talvez os níveis dessas alterações não tenham sido suficientes para favorecer a penetração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e/ou outros componentes derivados do agente clareador para causar efeitos tóxicos sobre as células em cultura. Também é possível que o tempo de armazenamento não tenha sido suficiente para promover a aceleração da degradação da interface adesiva por hidrólise, para o adesivo autocondicionante. Abdalla e Feilzer<sup>1,2</sup> (2008, 2009) utilizaram tempos de armazenamento de restaurações de resina composta bem mais longos (4 anos e 2 anos, respectivamente) quando utilizaram adesivos autocondicionantes. Os autores também observaram que o método de armazenamento pode influenciar a resistência adesiva. O contato direto com a água favorece a degradação da interface adesiva (no caso de armazenamento de espécimes em forma de palitos para a realização de testes de microtração).

Por outro lado, o armazenamento de dentes restaurados sem que antes seja feita a secção em palitos não promove diferenças estatisticamente significativas quanto à redução de resistência adesiva, mesmo após 4 anos de armazenamento em água<sup>1</sup>. Na presente pesquisa o contato da água com a interface adesiva foi feita de modo indireto. Os discos restaurados que foram armazenados em água possuíam margens em esmalte, o que poderia ter dificultado o processo de degradação da interface adesiva.

Quando foi realizada a avaliação do efeito da frequência de aplicação do gel clareador sobre o metabolismo celular (1 aplicação vs. 3 aplicações) houve diminuição estatisticamente significativa do metabolismo sempre que o gel foi aplicado por três vezes consecutivas sobre a superfície dos discos, para ambos os tempos de armazenamento. Trabalhos de citotoxicidade de agentes clareadores também observaram que quanto maior o número de aplicações do gel clareador e o tempo de contato com a estrutura dentária, mais tóxico se tornava o procedimento<sup>18,72,91</sup>.

A presença de restauração de resina composta, com os parâmetros utilizados durante a presente pesquisa *in vitro*, não causou um aumento significativo de citotoxicidade do procedimento clareador, mesmo quando as restaurações foram armazenadas por 6 meses. Entretanto, é necessário realizar exame clínico minucioso diante de restaurações previamente existentes antes de se iniciar qualquer técnica de clareamento dentário investigando-se, principalmente, sinais clínicos de infiltração marginal das restaurações o que poderia levar a um aumento da penetração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em direção ao tecido pulpar<sup>93,94</sup>. Outro fator importante durante o clareamento de dentes restaurados é o efeito do agente clareador sobre as restaurações. É demonstrado na literatura que, a utilização do peróxido de hidrogênio (30-35%) causa mudanças na textura de restaurações de resina composta<sup>11</sup>. A alteração da textura superficial pode levar a uma maior aderência de bactérias orais sob a superfície das restaurações<sup>81</sup>, podendo elevar os riscos de recidiva de cárie. Portanto, também é de relevante importância o exame das restaurações logo após o procedimento de clareamento dental. Caso essas restaurações não

necessitem de substituição, talvez seja necessária a realização de seu polimento<sup>65</sup>.

Os agentes clareadores podem influenciar no selamento marginal das restaurações, determinando a substituição da restauração após o tratamento clareador. Existe uma controvérsia na literatura com relação a esse assunto. Alguns trabalhos demonstraram que a aplicação tanto de peróxido de carbamida (10-16%) quanto de peróxido de hidrogênio a 35% afeta significativamente o selamento marginal de restaurações de resina composta em esmalte e dentina<sup>22,93,94</sup>, promovendo um aumento da microinfiltração marginal<sup>94</sup>. Outros estudos demonstraram que os efeitos causados pelos agentes clareadores na interface dente/restauração são insignificantes<sup>23,69</sup>. Além disso, trabalhos na literatura demonstraram que a exposição direta da interface adesiva de restaurações de resina composta ao peróxido de carbamida em diferentes concentrações pode causar diminuição da resistência adesiva ao esmalte<sup>6,16</sup> e à dentina<sup>16</sup>. Portanto, é necessário realizar exame clínico para decidir se uma restauração de resina composta deve ou não ser substituída após o clareamento dental. A troca da restauração não é obrigatoriamente requerida após o clareamento dental por motivos dessa natureza. Entretanto, a substituição das restaurações é freqüentemente realizada devido a fatores estéticos e não a alterações das propriedades mecânicas do material restaurador, pois a cor da restauração não condiz mais à cor dos dentes após o clareamento dental. Deste modo, a troca da restauração é muito freqüente e alguns cuidados devem ser tomados diante dessa decisão. Vários estudos foram realizados sobre a resistência adesiva de restaurações de resina composta confeccionadas em dentes que receberam a aplicação de agentes clareadores. Foi comprovado que, se houver necessidade de troca das restaurações após o clareamento dental tanto caseiro quanto de consultório, este procedimento deve ser realizado após uma semana do clareamento dental<sup>61,62,86,87</sup>, quando não existe mais a presença de oxigênio residual no esmalte clareado. Os trabalhos têm demonstrado que a resistência adesiva das restaurações diminui significativamente quando a restauração é realizada imediatamente após o clareamento da estrutura



dentária<sup>28,61,88</sup>. A liberação de oxigênio pode interferir na infiltração do sistema adesivo em esmalte e dentina<sup>61,90</sup> ou promover a inibição da polimerização dos monômeros resinosos<sup>71</sup>. Outro cuidado que pode ser tomado é a aplicação de agentes anti-oxidantes como a catalase e o ascorbato de sódio nas cavidades previamente à confecção da restauração para neutralizar as espécies reativas de oxigênio como o peróxido de hidrogênio<sup>52,53,93</sup>.

Diante dos resultados obtidos na presente pesquisa pode-se especular que a aplicação do gel clareador com 35% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante 15 minutos possui baixa citotoxicidade quando comparada a três aplicações do gel. As restaurações de resina composta não influenciaram na citotoxicidade da técnica de clareamento e o procedimento de armazenamento por 6 meses talvez não promoveu níveis de degradação da interface adesiva suficientes para aumentar a penetração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Entretanto, quando se realiza a técnica de clareamento dentário no consultório, os pacientes podem apresentar dentes que foram restaurados com resina composta há muito tempo. Nessas situações não se pode prever a condição da interface adesiva. Além disso, a técnica adesiva requer passos criteriosos para se obter uma restauração de qualidade, que durante uma metodologia *in vitro* podem ser melhor controlados. Portanto, mais trabalhos são requeridos para verificar a possível influência das restaurações de resina composta em situações normais e em situações de comprovada degradação da interface adesiva, sobre a toxicidade da técnica de clareamento dentário.

---

## *Conclusão*

---



## 6 CONCLUSÃO

De acordo com a metodologia empregada neste estudo pode-se concluir que:

1- Três aplicações consecutivas do agente clareador com 35% de  $H_2O_2$  sobre o esmalte causou maior citotoxicidade para as células odontoblastóides MDPC-23 em cultura do que quando aplicado somente por uma vez.

2- A aplicação do agente clareador com 35% de  $H_2O_2$  por três vezes sobre o esmalte foi citotóxico para as células MDPC-23, independente da presença da restauração de resina composta ou dos procedimentos de envelhecimento in vitro dos discos.

---

## *Referências*

---



## 7 REFERÊNCIAS\*

1. Abdalla AI, Feilzer AJ. Four-year water degradation of a total-etch and two self-etching adhesives bonded to dentin. *J Dent.* 2008; 36: 611-7.
2. Abdalla AI, Feilzer AJ. Two-year Water Degradation of Self-etching Adhesives Bonded to Bur Ground Enamel. *Oper Dent.* 2009; 34: 732-40.
3. Al-Salehi SK, Hattona PV, Millera CA, McLeod BC, Joinerc A. The effect of carbamide peroxide treatment on metal ion release from dental amalgam. *Dent Mater.* 2006; 22: 948-53.
4. Amaral FB, Colluci V, Palma-Dib RG, Corona SAM. Assessment of in vitro methods used to promote adhesive interface degradation: a critical review. *J Esthet Restor Dent.* 2007; 19: 340-54.
5. Aranha AMF, Souza PPC, Giro EMA, Hebling J, Costa CAS. Effect of Curing regime on the cytotoxicity of resin-modified glass-ionomer cements applied to an odontoblast-cell line. *Dent Mater.* 2006; 22: 864-9.
6. Barcellos DC, Benetti P, Fernandes Junior VVB, Valera MC. Effect of Carbamide Peroxide Bleaching Gel Concentration on the Bond Strength of Dental Substrates and Resin Composite. *Oper Dent.* 35: 463-9.
7. Benetti AR, Valera MC, Mancini MNG, Miranda CB, Baldicci I. In vitro penetration of bleaching agents into the pulp chamber. *Int Endod J.* 2004; 37: 120-4.
8. Bowles WH, Thompson LR. Vital bleaching: the effects of heat and hydrogen peroxide on pulpal enzymes. *J Endod.* 1986; 12: 108-12.
9. Bowles WH, Ugwuneri Z. Pulp chamber penetration by hydrogen peroxide following vital bleaching procedures. *J Endod.* 1987; 13: 375-7.
10. Bowels WH, Burns H. Catalase/peroxidase activity in dental pulp. *J Endod.* 1992; 18: 527-34.

\* De acordo com o Estilo Vancouver. Disponível no site: [http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform\\_requirements.html](http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html)

11. Bowles WH, Lancaster LS, Wagner MJ. Reflectance and texture changes in bleached composite resin surfaces. *J Esthet Dent.* 1996; 8: 229-33.
12. Bruzell EM, Johnsen B, Aalerud TN, Dahl JE, Christensen T. In vitro efficacy and risk for adverse effects of light-assisted tooth bleaching. *Photochem Photobiol Sci.* 2009; 8: 377-85.
13. Buchalla W, Attin T. External bleaching therapy with activation by heat, light or laser - a systematic review. *Dent Mater.* 2007; 23: 586-96.
14. Camargo SEA, Valera MC, Camargo CHR, Mancini MNG, Menezes MM. Penetration of 38% hydrogen peroxide into the pulp chamber in bovine and human teeth submitted to office bleach technique. *J Endod.* 2007; 33: 120-4.
15. Camargo SE, Cardoso PE, Valera MC, de Araújo MA, Kojima AN. Penetration of 35% hydrogen peroxide into the pulp chamber in bovine teeth after LED or Nd:YAG laser activation. *Eur J Esthet Dent.* 2009; 4: 82-8.
16. Cavalli V, Carvalho RM, Giannini M. Influence of carbamide peroxide-based bleaching agents on the bond strength of resin-enamel/dentin interfaces. *Braz Oral Res.* 2005; 19: 23-9.
17. Cohen SC, Chase C. Human pulpal response to bleaching procedures on vital teeth. *J Endod.* 1979; 5: 134-8.
18. Coldebella CR, Ribeiro AP, Sacono NT, Trindade FZ, Hebling J, Costa CA. Indirect cytotoxicity of a 35% hydrogen peroxide bleaching gel on cultured odontoblast-like cells. *Braz Dent J.* 2009; 20: 267-74.
19. Cooper JS, Bokmeyer TJ, Bowles WH. Penetration of the pulp chamber by carbamide peroxide bleaching agents. *J Endod.* 1992; 18: 315-7.
20. Costa CAS, Hanks CT. Capacity of L 929 and BALC/C 3T7 fibroblasts to survive on human dentin discs. *Braz Endod J.* 1998; 3: 7-13.

21. Costa CAS, Hebling J, Hanks CT. Effects of light-curing time on the cytotoxicity of a restorative resin composite applied to an immortalized odontoblast-cell line. *Oper Dent*. 2003; 28: 365-70.
22. Crim GA. Post-operative bleaching: effect on microleakage. *Am J Dent*. 1992; 5: 109-12.
23. Crim GA. Prerestorative bleaching: effect on microleakage of class V cavities. *Quintessence Int*. 1992; 23: 823-5.
24. Dalh JE, Pallesen U. Tooth bleaching – A critical review of the biological aspects. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2003; 14: 292-304.
25. De Munck J, Van Landuyt K, Peumans M, Poitevin A, Lambrechts P, Braem M, Van Meerbeek B. A critical review of the durability of adhesion to tooth tissue: methods and results. *J Dent Res*. 2005; 84: 118-32.
26. De Souza Costa CA, Riehl H, Kina JF, Sacono NT, Hebling J. Human pulp responses to in-office tooth bleaching. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2010; 109: 59-64.
27. Dias Ribeiro AP, Sacono NT, Lessa FCR, Nogueira I, Coldebella CR, Hebling J et al. Cytotoxic effect of a 35% hydrogen peroxide bleaching gel on odontoblast-like MDPC-23 cells. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2009; 108: 458-64.
28. Dishman MV, Covey DA, Bayghan LW. The effects of peroxide bleaching on composite to enamel bond strength. *Dent Mater*. 1994; 10: 33-6.
29. Esposito P, Varvara G, Murmura G, Terlizzi A, Caputi S. Ability of healthy and inflamed human dental pulp to reduce hydrogen peroxide. *Eur J Oral Sci*. 2003; 111: 454-6.
30. Ferracane JL, Cooper PR, Smith AJ. Can interaction of materials with the dentin–pulp complex contribute to dentin regeneration? *Odontology*. 2010; 98: 2-14.

31. Fukuyama Y, Ohta K, Okoshi R, Kizaki H, Nakagawa K. Hydrogen peroxide induces expression and activation of AMP-activated protein kinase in a dental pulp cell line. *Int End J.* 2008; 41: 197-203.
32. Gale MS, Darvell BW. Thermal cycling procedures for laboratory testing of dental materials restorations. *J Dent.* 1999; 27: 89-99.
33. Gökay O, Tuncbilek M, Ertan R. Penetration of the pulp chamber by carbamide peroxide bleaching agents on teeth restored with a composite resin. *J Oral Rehabil.* 2000; 27: 428-31.
34. Gökay O, Müjdecı A, Algin E. Peroxide penetration into the pulp from whitening strips. *J Endod.* 2004; 30: 887-9.
35. Gökay O, Müjdecı A, Algin E. In vitro peroxide penetration into the pulp chamber from newer bleaching products. *Int Endod J.* 2005; 38: 516-20.
36. Gökay O, Yılmaz F, Akin S, Tuncbilek M, Ertan R. Penetration of the pulp chamber by bleaching agents in teeth restored with various restoratives materials. *J Endod.* 2000; 26: 92-4.
37. Goldberg M, Smith AJ. Cells and extracellular matrices of dentin and pulp: a biological basis for repair and tissue engineering. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2004; 15: 13-27.
38. Graham L, Cooper PR, Cassidy N, Nor JE, Sloan AJ, Smith AJ. The effect of calcium hydroxide on solubilisation of bi-active dentin matrix components. *Biomaterials.* 2006; 27: 2865-73.
39. Hanks CT, Fat JC, Wataha JC, Corcoran JF. Cytotoxicity and dentin permeability of carbamide peroxide and hydrogen peroxide vital bleaching materials, in vitro. *J Dent Res.* 1993; 72: 931-8.
40. Hanks CT, Sun ZL, Fang DN, Edwards CA, Wataha JC, Ritchie HH et al. Cloned 3T6 cell line from CD-1 mouse fetal molar dental papillae. *Connect Tissue Res.* 1998; 37: 233-249.



41. He WX, Niu ZY, Zhao SL, Jin WL, Gao J, Smith AJ. TGF –  $\beta$  activated leads to a Smad3 – mediated down – regulation of DSPP in an odontoblast cell line. *Arch Oral Biol.* 2004; 49: 911-8.
42. Hebling J, Giro EMA, Costa CAS. Human pulp response after an adhesive system application in deep cavities. *J Dent.* 1999; 27: 557-64.
43. Hein DK, Ploeger BJ, Hartup JK, Wagstaff RS, Palmer TM, Hansen LD. In-office vital tooth bleaching - what do lights add? *Compend Contin Educ Dent.* 2003; 24: 340-52.
44. Howell RA. Bleaching discolored root-filled teeth. *Br Dent J.* 1980; 148: 159-62.
45. ISO – guidance on testing of adhesion to tooth structure. International Organization for Standardization. TR 11450, 1-14. Geneva (Switzerland): 1994.
46. Joiner A. Tooth colour: a review of the literature. *J Dent.* 2004; 32: 3-12.
47. Kanno S, Shouji A, Asou K, Ishikawa M. Effects of naringin on hydrogen peroxide-induced cytotoxicity and apoptosis in P388 cells. *J Pharmacol Sci.* 2003; 92: 166-70.
48. Kawamoto K, Tsujimoto Y. Effects of the hydroxyl radical and hydrogen peroxide on tooth bleaching. *J Endod.* 2004; 56: 274-7.
49. Kina JF, Huck C, Riehl H, Martinez TC, Sacono NT, Ribeiro APD et al. Response of human pulps after professionally applied vital tooth bleaching. *Int Endod J.* 2010; 43: 572-80.
50. Kitasako Y, Burrow MF, Nikaido T, Tagami J. The influence of storage solution on dentin bond durability of resin cement. *Dent Mater.* 2000; 16: 1-6.

51. Kwon YH, Huo MS, Kim KH, Kim SK, Kim YJ. Effects of hydrogen peroxide on the light reflectance and morphology of bovine enamel. *J Oral Rehabil.* 2002; 29: 473-7.
52. Lai SCN, Mak YF, Cheung GSP, Osório R, Toledano M, Carvalho RM et al. Reversal of compromised bonding to oxidized etched dentin. *J Dent Res.* 2001; 80: 1919-24.
53. Lai SCN, Tay FR, Cheung GSP, Mak YF, Carvalho RM, Wei SHY et al. Reversal of compromised bonding in bleached enamel. *J Dent Res.* 2002; 81: 477-81.
54. Lanza CRM, Costa CAS, Alecio AC, Furlan M, Hebling J. Transdental diffusion and cytotoxicity of self-etching adhesive systems. *Cell Biol Toxicol.* 2009; 25: 533-43.
55. Li Y. Biological properties of peroxide-containing tooth whiteners. *Food Chem Toxicol.* 1996; 34: 887-904.
56. Lima DA, Aguiar FH, Liporoni PC, Munin E, Ambrosano GM, Lovadino JR. In vitro evaluation of the effectiveness of bleaching agents activated by different light sources. *J Prosthodont.* 2009; 18: 249-54.
57. Lima AF, Soares GP, Vasconcelos PH, Ambrosano GMB, Marchi GM, Lovadino JR et al. Effect of surface sealants on microleakage of class II restorations after thermocycling and long-term water storage. *J Adhes Dent.* 2010 (In Press).
58. Mantellini MG, Botero T, Yaman P, Dennison JB, Hanks CT, Nör JE. Adhesive resin and the hydrophilic monomer HEMA induce VEGF expression on dental pulp cells and macrophages. *Dent Mater.* 2006; 22: 434-40.
59. Martindale JL, Holbrook NJ. Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival. *J Cell Physiol.* 2002; 192: 1-15.

60. Mazzoni A, Mannello F, Tay FR, Tonti GA, Papa S, Mazzotti G et al. Zymographic analysis and characterization of MMP-2 and -9 forms in human sound dentin. *J Dent Res.* 2007; 86: 436-40.
61. McGuckin RS, Thurmaond BA, Osovitz S. Enamel shear bond strength after vital bleaching. *Am J Dent.* 1992; 5: 216-22.
62. Miles PG, Pontier JP, Bahiraei D, Close J. The effect of carbamide peroxide bleach on the tensile bond strength of ceramic brackets-an in vitro study. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 1994; 106: 371-5.
63. Minoux M, Serfaty R. Vital tooth bleaching: biologic adverse effects - a review. *Quintessence Int.* 2008; 39: 645-59.
64. Miyazaki M, Sato M, Onose H, Morre, BK. Influence of thermal cycling on dentin bond strength of two step bonding systems. *Am J Dent.* 1998; 11: 118-22.
65. Mor C, Steinberg D, Dogan H, Rotstein I. Bacterial adherence to bleached surfaces of composite resin in vitro. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1998; 86: 582-6.
66. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 1983; 65: 55-63.
67. Nathanson D. Vital tooth bleaching: sensitivity and pulpal considerations. *J Am Dent Assoc.* 1997; 128: 41-4.
68. Nikaido T, Kunzelmann KH, Chen H, Ogata M, Harada N, Yamaguchi S et al. Evaluation of thermal cycling and mechanical loading on bond strength of a self-etching primer system to dentin. *Dent Mater.* 2002; 18: 269-75.

69. Owens BM, Rowland CC, Brown DM, Covington III JS. Postoperative dental bleaching: effect of microleakage on class V tooth colored restorative materials. *J Tenn Dent Assoc.* 1998; 78: 36-40.
70. Pashley DH, Tay FR, Yiu C. Collagen degradation by host-derived enzymes during aging, *J Dent Res.* 2004; 83: 216-21.
71. Rueggeberg FA, Magerson DH. The effect of oxygen inhibition on an unfilled/filled composite resin. *J Dent Res.* 1990; 69: 1652-8.
72. Sacono NT, Coldebella CR, Ribeiro APD, Soares DGS, Trindade FZ, Hebling J et al. Efeito citotóxico de agentes clareadores a base de peróxido de hidrogênio a 20% e 38% sobre células odontoblastóides. *Rev Odontol Bras Central.* 2010; 18: 15-21.
73. Saito Y, Nishio K, Ogawa Y, Kimata J, Kinumi T, Yoshida Y et al. Turning point in apoptosis/necrosis induced by hydrogen peroxide. *Free Radic Res.* 2006; 40: 619-30.
74. Sauro S, Pashley DH, Montanari M, Chersoni S, Carvalho RM, Toledano M et al. Effect of simulated pulpal pressure on dentin permeability and adhesion of self-etch adhesives. *Dent Mater.* 2007; 23: 705-13.
75. Schiavoni RJ, Turssi CP, Rodrigues Jr AL, Serra MC, Pécora, JD, Fröner IC. Effect of bleaching agents on enamel permeability. *Am J Dent.* 2006; 19: 313-16.
76. Schilke R, Lisson JA, Baub O, Geurtsen W. Comparison of the number and diameter of dentinal tubules in human and bovine dentine by scanning electron microscopic investigation. *Arch Oral Biol.* 2000; 45: 355-61.
77. Schulte JR, Morrissette DB, Gasior EJ, Czajewski MV. The effects of bleaching time on the dental pulp. *J Am Dent Assoc.* 1994; 125: 1330-35.

78. Seale NS, Wilson CFG. Pulpal response of bleaching of teeth in dogs. *Pediatr Dent*. 1985; 7: 209-14.
79. Shackelford RE, Kaufmann WK, Paules RS. Oxidative stress and cell cycle checkpoint function. *Free Radic Biol Med*. 2000; 28: 1387-404.
80. Souza PPC, Aranha AMF, Hebling J, Costa CAS. In vitro cytotoxicity and in vivo biocompatibility of contemporary resin-modified glass-ionomer cements. *Dent Mater*. 2006; 22: 838-44.
81. Steinberg D, Mor C, Dogan H, Zacks B, Rotstein I. Effect of salivary biofilm on the adherence of oral bacteria to bleached and non-bleached restorative material. *Dent Mater*. 1999; 15: 14-20.
82. Sulieman M, Addy M, Rees JS. Surface and intra-pulpal temperature rises during tooth bleaching: an in vitro study. *Br Dent J*. 2005; 199: 37-40.
83. Sulkala M, Pääkkönen V, Larmas M, Salo T, Tjäderhane L. Matrix metalloproteinase-13 (MMP-13, collagenase-3) is highly expressed in human tooth pulp. *Connect Tissue Res*. 2004; 45: 231-7.
84. Sulkala M, Tervahartiala T, Sorsa T, Larmas M, Salo T, Tjäderhane L. Matrix metalloproteinase-8 (MMP-8) is the major collagenase in human dentin. *Arch Oral Biol*. 2007; 52: 121-7.
85. Tay FR, Pashley DH, Loushine RJ, Weller RN, Monticelli F, Osorio R. Self-etching adhesives increase collagenolytic activity in radicular dentin. *J Endod*. 2006; 32: 862-8.
86. Teixeira EC, Hara AT, Turssi CP, Serra MC. Effect of nonvital tooth bleaching on resin/enamel shear bond strength. *J Adhes Dent*. 2002; 4: 317-22.

87. Teixeira EC, Hara AT, Turssi CP, Serra MC. Effect of non-vital tooth bleaching on microleakage of coronal access restorations. *J Oral Rehabil.* 2003; 30: 1123-7.
88. Titley KC, Torneck CD, Ruse ND, Krmec D. Adhesion of a resin composite to bleached and unbleached human enamel. *J Endod.* 1993; 19: 112-5.
89. Tomson PL, Grover LM, Lumley PJ, Sloan AJ, Smith AJ, Cooper PR. Dissolution of bio-active dentine matrix components by mineral trioxide aggregate. *J Dent.* 2007; 35: 636-42.
90. Torneck CD, Titley KC, Smith DC, Adibfar A. Adhesion of light-cured composite resin to bleached and unbleached bovine dentin. *Endod Dent Traumatol.* 1990; 6: 97-103.
91. Trindade FZ, Ribeiro APD, Sacono NT, Oliveira CF, Lessa FCR, Hebling J et al. Trans-enamel and trans-dentinal cytotoxic effects of a 35% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bleaching gel on cultured odontoblast cell lines after consecutive applications. *Int Endod J.* 2009; 42: 516-24.
92. Truman J. Bleaching of non-vital discoloured anterior teeth. *Dent Times.* 1864; 1: 69-72.
93. Turkun M, Turkun LS. Effect of nonvital bleaching with 10% carbamide peroxide on sealing ability of resin composite restorations. *Int Endod J.* 2004: 52-60.
94. Ulukapi H, Benderli Y, Ulukapi I. effect of pre- and post-operative bleaching on marginal effect of leakage of amalgam and composite restorations. *Quintessence Int.* 2003; 34: 505-8.
95. Watts A, Addy M. Tooth discolouration and staining: a review of the literature. *Br Dent J.* 2001; 190: 309-15.

96. Wetter NU, Walverde D, Kato IT, Eduardo CP. Bleaching efficacy of whitening agents activated by xenon lamp and 960-nm diode radiation. *Photomed Laser Surg.* 2004; 22: 489-93.
97. Zantner C, Beheim-Schwarzbach N, Neumann K, Kielbassa AM. Surface microhardness of enamel after different home bleaching procedures. *Dent Mater.* 2007; 2: 243-50.

---

# *Anexos*

---





## 8 ANEXOS

### 8.1 Valores em porcentagem de metabolismo celular (teste de MTT)

**Anexo 1-** Dados em porcentagem de metabolismo celular obtidos pelo teste de MTT referentes ao experimento no qual o gel clareador foi aplicado somente uma vez

Amostras	24 horas				6 meses			
	Ínt.	Ínt. Cl.	Rest.	Rest. Cl.	Ínt.	Ínt. Cl.	Rest.	Rest. Cl.
1	95,164	125,147	104,028	92,165	90,080	95,424	96,076	98,553
2	98,683	105,723	95,424	85,256	89,688	89,037	93,469	104,810
3	106,179	136,358	96,989	105,853	85,908	129,840	89,819	124,364
4	108,138	98,357	109,449	88,735	105,613	87,393	94,905	79,913
5	98,165	92,316	84,548	88,352	69,972	85,507	76,493	73,584
6	93,690	88,735	86,274	83,301	73,232	91,293	91,069	80,456
7	97,060	76,708	100,924	86,465	112,839	86,884	117,734	82,053
8	102,567	87,689	103,082	101,794	117,283	82,858	119,827	78,865
9	97,607	88,687	99,153	86,240	113,129	92,004	116,124	56,078
10	102,760	86,594	91,296	77,545	108,009	80,379	99,990	-----

Ínt.- Íntegros

Ínt. Cl.- Íntegros clareados

Rest.- Restaurados

Rest. Cl.- Restaurados clareados

□ 1° Momento

■ 2° Momento

■ 3° Momento

**Anexo 2-** Dados em porcentagem de metabolismo celular obtidos pelo teste de MTT referentes ao experimento no qual o gel clareador foi aplicado por três vezes consecutivas

Amostras	24 horas				6 meses			
	Ínt.	Ínt. Cl.	Rest.	Rest. Cl.	Ínt.	Ínt. Cl.	Rest.	Rest. Cl.
1	99,435	82,061	112,878	54,087	110,842	72,760	95,399	84,623
2	94,661	74,971	107,859	80,201	112,562	57,738	102,208	64,371
3	98,873	56,474	115,545	80,587	-----	-----	-----	-----
4	100,698	68,934	106,174	78,270	-----	-----	-----	-----
5	106,314	64,020	115,370	70,654	-----	-----	-----	-----
6	91,290	69,014	111,902	64,116	101,242	46,862	101,365	68,398
7	101,396	56,998	103,737	70,617	97,729	67,505	98,746	65,132
8	101,118	57,553	89,719	57,615	-----	-----	-----	-----
9	102,474	59,648	103,306	58,046	-----	-----	-----	-----
10	103,706	60,696	109,129	58,601	-----	-----	-----	-----
11	100,129	51,758	111,460	50,496	99,144	34,978	105,364	51,142
12	98,313	34,485	103,516	49,233	96,034	35,162	85,412	34,546
13	91,015	33,592	101,330	36,255	-----	-----	-----	-----
14	102,069	39,627	102,685	43,691	-----	-----	-----	-----
15	108,473	41,166	105,394	47,263	-----	-----	-----	-----

Ínt.- Íntegros

Ínt. Cl.- Íntegros clareados

Rest.- Restaurados

Rest. Cl.- Restaurados clareados

1° Momento

2° Momento

3° Momento