



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARAÇATUBA

DEPARTAMENTO DE ODONTOLOGIA RESTAURADORA

Marjorie de Oliveira Gallinari

**Influência do peróxido e do uso de diferentes substâncias de
combate à dor na inflamação e na expressão de
neuropeptídeos pró-inflamatórios após o tratamento clareador**



**Araçatuba
2016**

Marjorie de Oliveira Gallinari

Dissertação de Mestrado

**Influência do peróxido e do uso de diferentes substâncias de
combate à dor na inflamação e na expressão de
neuropeptídeos pró-inflamatórios após o tratamento clareador**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Araçatuba, da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" - UNESP, para obtenção do Grau de "Mestre em Odontologia" - Área de concentração: Dentística.

Orientador: Prof. Adj. André Luiz Fraga Briso

Co-orientador: Prof. Adj. Luciano Tavares Ângelo Cintra

**Araçatuba
2016**

Catálogo na Publicação (CIP)

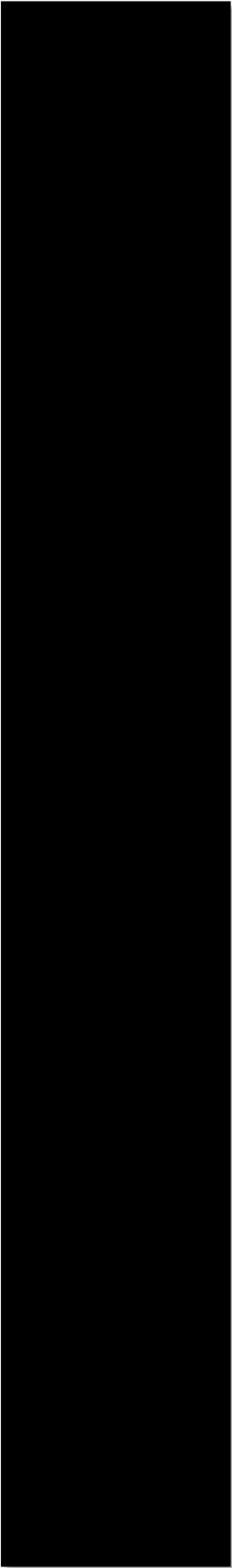
Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

G169 Gallinari, Marjorie de Oliveira.
Influência do peróxido e do uso de diferentes substâncias de combate à dor na inflamação e na expressão neuropeptídeos pró-inflamatórios após o tratamento clareador / Marjorie de Oliveira Gallinari. - Araçatuba, 2016
89 f. : il. ; tab. + 1 CD-ROM

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Orientador: Prof. André Luiz Fraga Briso

1. Clareamento dental 2. Inflamação 3. Neuropeptídeos
4. Substância P 5. Receptores de peptídeo relacionado com o gene de calcitonina I. Título

Black D2
CDD 617.6



Dedicatória

Aos meus queridos pais, Dozinetti e Edna

Dedico não só este mestrado, mas sim minha vida inteira, a vocês, que me deram a oportunidade de viver e me ensinaram a vivê-la com dignidade. A vocês, que muitas vezes tiveram paciência, compreensão e que não mediam esforços para me acalmar nos momentos mais difíceis da minha vida. A vocês, que se doaram inteiros e que muitas vezes renunciaram aos seus sonhos e desejos, para que, eu pudesse alcançar os meus objetivos. Pela longa espera e compreensão durante as longas viagens. A vocês, pais por natureza, por opção e amor, que dedicaram a vida inteira de vocês para dar uma vida excelente para mim e para minha irmã. Um somente “muito obrigada” não bastaria para sanar tudo o que fizeram por mim. Serei eternamente grata pela vida maravilhosa que vocês me deram, pela família linda e amada, e todas as palavras sábias que me dirigiram na ocasião certa, sempre me acalentando com tanto amor e preocupação. Então é por meio desse resultado obtido após tantos anos de luta e dificuldades que dedico inteiramente não só o mestrado, mas como minha vida inteira, como forma de agradecimento por tudo que fizeram por mim, porque com palavra seria incapaz de retribuir tanto amor que vocês me deram.

Amo vocês!

À minha querida Irmã, Cunhado e sobrinho

À minha irmã Belize, ao meu cunhado Juninho que amo muito, e que me proporcionaram uma alegria ímpar, de confiar em mim a responsabilidade de ser madrinha do meu querido e amado afilhado Heitor, uma criança cheia de luz que veio nos encher de alegria e muito amor. Obrigada por essa responsabilidade que serei grata eternamente.

Aos meus queridos avós e avôs

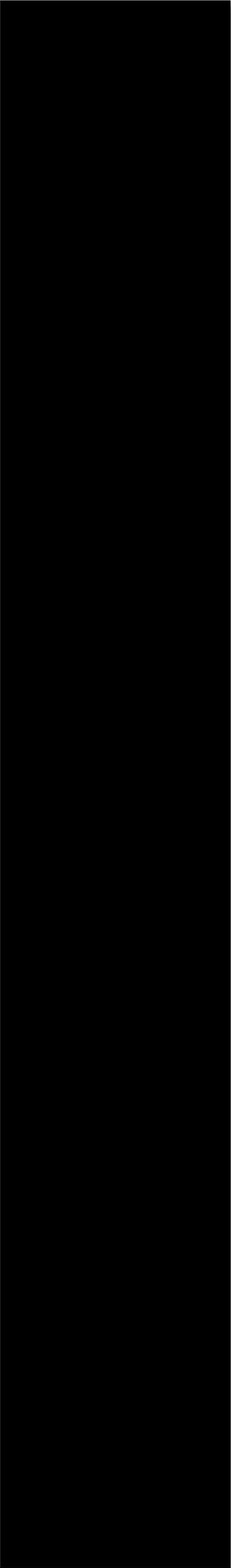
Aos meus avós falecidos Vó Elvira, Vó Denisia e Vô Vicente, sei que vocês, de qualquer lugar que estejam, sempre estiveram do meu lado, me dando forças, acreditando no meu potencial, e torcendo por mim. Alguns momentos, que queria desistir e sentia que não tinha mais forças para continuar, do nada surgia uma vontade de lutar e ir em diante, que no



Dedicatória

*momento me parecia até estranho. Mas hoje paro e penso: certeza que eram vocês, meus anjos, tentando me ajudar, me acalmando e me dando forças para continuar. Obrigada meus anjos, obrigada por serem meus avós tão queridos e amados. E ao meu **avô Vito**, meu único avô presente, o meu muito obrigado por ter me acompanhado, e vibrado com cada vitória minha.*





Agradecimento

Especial

Ao Prof. Adj. André Luiz Fraga Briso

Professor, orientador e muitas vezes amigo. Durante esses 6 anos de convivência aprendi muitas coisas, entre elas desde procedimentos laboratoriais, até ter mais paciência com algumas situações do dia-a-dia de laboratório e fora também. Agradeço muito por ter me escolhido como orientada no meu 3º ano de faculdade. Mesmo com medo da fama de professor “bravo”, levantei a cabeça e encarei. Acabou que no final das contas, me deparei não com um professor bravo, mas sim com um orientador exigente, metódico e um orientador que gosta das coisas certas. Isso não são defeitos, pelo contrário, no meu ponto de vista é o que te faz ser um excelente pesquisador e professor, e hoje em dia agradeço por ter sido rígido comigo, pois me ajudou muito a crescer e amadurecer durante todos esses anos. Apesar de ser rígido, o professor sempre soube o momento certo para elogiar e dar valor no trabalho quando está realmente bom, e quando elogiava não media palavras para mostrar que estava no caminho certo. Obrigada pela liberdade de que você me deu ao longo desses anos para conversar sobre diversos assuntos. O que sou e o que sei hoje, devo muito ao professor, por ter me estimulado. Tenho um carinho e uma admiração enorme pelo senhor, pois foi você quem me criou cientificamente, sou devedora de muitas coisas boas ensinadas e serei eternamente grata por tudo. Obrigada!!!

Ao Prof. Adj. Luciano Tavares Ângelo Cintra

Um agradecimento especial ao meu Co-Orientador, que sempre se mostrou disponível e atencioso quando precisei. Inicialmente para desenvolver a escrita do meu projeto, me ajudando a escrever, disponibilizando artigos e projetos para me direcionar. Quando chegou na parte experimental, na montagem das lâminas sempre checando para ver se estava tudo certo. Sempre se mostrou muito calmo e paciente, para me ajudar a analisar, pois era a primeira vez que analisava lâminas histológicas, e o professor acabou que ajudou a tornar em algo fácil e prazeroso de se trabalhar. Certamente participou de modo positivo na minha formação como pesquisadora. Sou muito grata pela orientação, atenção e dedicação a minha pessoa quando precisei. Ao senhor que é um exemplo de competência e dedicação ao trabalho, deixo o meu muito obrigada por permitir que isso tudo acontecesse.

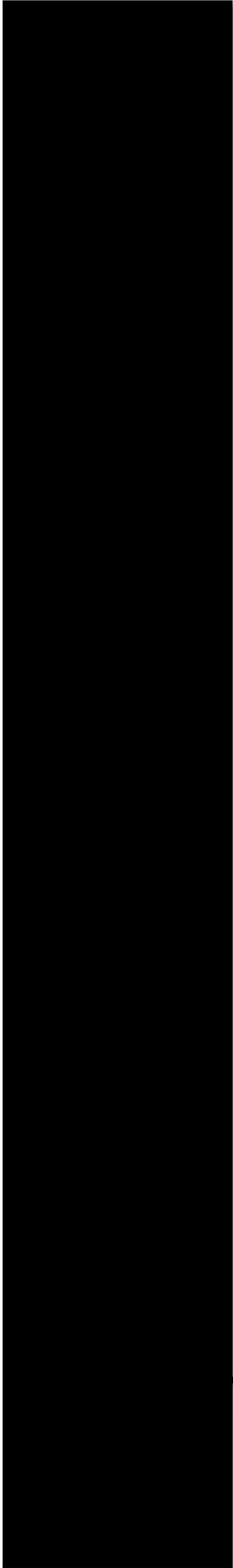


Agradecimento Especial

Ao Prof. Dr. Edilson Ervolino

De modo muito especial agradeço ao Prof. Dr. Edilson Ervolino por ter me recebido gentilmente em seu laboratório de pesquisa de Histologia desta universidade. Foi um prazer poder trabalhar com o senhor, ganhei muita experiência, muito aprendizado. Obrigada por ser tão compreensivo, atencioso, e muitas vezes vinha com conversas descontraídas para dar um pouco de risada. Desde o início do projeto sempre se mostrou prestativo, sempre ajudando que era possível. Faltam palavras para te agradecer toda a ajuda na execução do meu projeto. Obrigada mais uma vez por me receber tão bem no laboratório e sempre sorridente, sem tempo ruim. Muito obrigada!





Agradecimentos

Agradecimentos

À Deus

Eu creio em um Deus que habita em meu coração e que transforma tudo ao meu redor. Creio em um universo que trabalha sempre a meu favor e me mostra sempre o melhor caminho a seguir. Creio na força dos anjos, que se ancoram ao meu lado quando a cruz parece pesada demais para eu suportar. Creio na alma humana, feita a imagem e semelhança de Deus e desta forma, nenhum mal me atinge.

Institucional

À Faculdade de Odontologia de Araçatuba – FOA - Unesp, na pessoa do Ilustríssimo Direto Professor Wilson Roberto Poi, por toda infra-estrutura oferecida. Completando meu oitavo ano nesta instituição, e não me canso de me orgulhar por tudo que esta faculdade faz pelos alunos e pela comunidade, tanto no âmbito clínico como na pesquisa, muito me orgulho de ser filho desta Universidade .

Ao Departamento de Odontologia Restauradora da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – FOA - UNESP, por permitir a utilização das instalações do departamento para o desenvolvimento do meu trabalho.

À Coordenadoria do Programa de Pós-Graduação em Odontologia, pela dedicação ao curso buscando sempre sua melhoria. Sou muito grato por carregar em minha formação o nome desta Universidade.

As funcionárias da seção de pós-graduação Valéria, Cristiane e Lilian que sempre muito pacientes e prestativos me ajudaram em vários momentos. Muito obrigado pelo carinho. Parabéns pela eficiência e dedicação de vocês.

Aos atuais funcionários do Departamento de Odontologia Restauradora Peterson, Nelci e Elaine por todo o convívio destes dois anos, ajudas, pelos momentos de risos e até mesmo pelas lágrimas e conselhos, por me acalmar quando alguma máquina queimava na minha mão rsrs. Não posso de deixar de mencionar os funcionários que me ajudaram muito

Marjorie de Oliveira Gallinari



Agradecimentos

*durante todos os 6 anos que passei no Departamento de Odontologia Restauradora: **Rosinha e Neuzinha** obrigada por me ajudar durante a minha graduação e o meu tempo que permaneci como Iniciação Científica, pelas conversas e risadas que certamente alegrou e facilitou, de alguma forma, a minha estadia durante todos esses anos no departamento. Agradecer também a **Cláudia** que sempre me ajudava no manuseio de soluções, algumas técnicas laboratoriais, e além disso, pelo convívio. Deixo o meu muito obrigado por todo o carinho e respeito que tiveram comigo durante minha estadia neste departamento.*

*A **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP**, pelo apoio desde minha iniciação científica (Processos nº 2009/01459-, 2010/10298-9) e no mestrado através do auxílio pesquisa concedido (Processo nº 2015/01366-4). Isso possibilitou muitas conquistas, sendo fundamental para o meu desenvolvimento como pesquisador. Parabéns pelos que a fazem uma Instituição de respeito e de orgulho do nosso estado.*

*À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES**, pela bolsa de mestrado concedida no período de março/2014 a fev/2016.*

*Aos vigias da **Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP**, o meu muito obrigado por sempre guardar a faculdade e pelas vezes que aparecia na madrugada e tinham que abrir o portão só para eu entrar e fazer meus experimentos. Muito obrigada!*

Aos Professores

*Aos professores da pós-graduação **Renato Herman Sundfeld e Paulo Henrique dos Santos** por toda a dedicação com o curso fazendo com que nós tivéssemos a melhor formação. Muito obrigado por todo o ensinamento e paciência que tiveram conosco. Deixo expressa minha grande admiração a vossas pessoas por muitas vezes não assumir a posição de professor e conversar de igual para igual nos incentivando, aconselhando e apoiando em nossas decisões pessoais. Muito obrigado por tudo, sempre referenciarei vocês com muito orgulho.*

*À minha eterna orientadora professora **Dóris Hissako Sumida** a quem agradeço eternamente por ter despertado esse espírito de pesquisadora em minha pessoa e fizesse com que eu desse continuidade aos meus estudos. Agradeço por toda a paciência e carinho que teve comigo em todas as vezes em que precisei de um conselho, certamente por toda a confiança*

Marjorie de Oliveira Gallinari



Agradecimentos

que tenho na senhora, não hesitava em procura-la. Deixo aqui minha eterna admiração e meu muito obrigado.

À professora **Sandra Rahal** a qual é um grande exemplo de profissional e pessoa, sempre com toda a bondade e dedicação a profissão tentando me ajudar desde as clínicas da graduação e posteriormente me dando todo o apoio para que eu me tornasse um mestre. Muito obrigado por todo o carinho.

À professora **Mara Antônio Monteiro de Castro** que além de uma excelente professora, profissional, é minha querida madrinha. Obrigada por sempre estar presente na minha vida, passando ensinamentos, experiências e aprendizados. Uma pessoa espetacular, de coração enorme e uma fé inabalável. A minha admiração pela senhora vai além das palavras. Obrigada por todo o carinho, certamente a madrinha é uma grande admiração para minha carreira. Agradeço também ao **José Antônio Monteiro de Castro** que participou da minha vida acadêmica, e também na minha vida pessoal. Obrigada por todos os momentos compartilhados.

Aos professores **Ricardo Coelho Okida** e **Silvio José Mauro** por contribuírem com minha formação. Grandes profissionais os quais gostaria de ter um pouco da qualidade de cada um. Sou grato a cada um de vocês, muito obrigado!

Ao professor **Eloi Dezan Junior** que felizmente tive a honra de conviver, trabalhar, além do mais, sempre me orientando e sanando minhas dúvidas quando precisei. Obrigada pela convivência durante todos esse tempo, por sempre ser simpático, brincalhão tornando o ambiente de trabalho mais prazeroso. Muito obrigado por todo o apoio, ajuda prestada, e principalmente pela paciência sempre teve comigo.

E aos demais professores do departamento de Odontologia Restauradora **Gustavo Sivieri de Araújo**, **Rogério**, **Ticiane Cestari Fagundes**, **João Eduardo Gomes Filho** obrigada pelo convívio e ensinamentos passados durante esses dois anos. Certamente contribuíram de alguma forma para o meu aprendizado.



Agradecimentos

À Banca Examinadora

*Certamente a escolha desta banca foi muito bem pensada. Pensada em professores que tivessem a competência e conhecimento de poder enriquecer este trabalho com toda perícia científica. É com grande satisfação que vou contar para a composição desta banca com a professora **Daniela Micheline dos Santos – FOA/UNESP** e **Lucas Silveira Machado – UFRGS**. Muito obrigada por aceitarem o meu convite.*

Aos Amigos

*À Brisete mór **Vanessinha** que sempre esteve comigo desde do começo da minha iniciação científica. Não tenho palavras para te agradecer por tudo o que você fez por mim durante todos esses tempos. Minha grande e eterna amiga, obrigada por tudo mesmo, pelos conselhos, pelas conversas, pelos ensinamentos que você compartilhou comigo. Com certeza aprendi muito com você durante todo esse tempo. Não tenho palavras suficientes para te agradecer por tudo o que você fez por mim. E agora você passando por essa fase maravilhosa que é ter uma criança linda e abençoada e sei que será muito, mas muito amada, a Clarinha é muito sortuda por ter você e o Fê como pais. Agradecer também ao seu queridíssimo marido **Felipe** pelas palhaçadas, conversas e também pela amizade. Vocês formam um casal lindo, que amo demais, e quero carregar essa amizade para minha vida inteira. Obrigada por serem meus amigos.*

*À **Letícia** que também esteve comigo desde o começo, me orientando nas pesquisas, obrigada pela amizade e pela ajuda que me proporcionou ao longo da minha estadia no laboratório. Obrigada pela paciência que sempre teve comigo.*

*À **Thais**, obrigada por sempre ser essa pessoa maravilhosa e sorridente que é, com certeza sempre que estivemos juntas, você alegrava meu dia, com essa sua risadinha gostosa de ouvir. Japinha linda, obrigada por toda a ajuda que você me deu durante todo o tempo que estive no departamento, me ajudando sempre que precisava, me acalmou várias vezes. Obrigada pela paciência e carinho, tenho enorme admiração por você, e tenho certeza que fará muito sucesso ainda na sua carreira.*

Marjorie de Oliveira Gallinari



Agradecimentos

Ao **Rafael Simões** que me aguentou por um bom tempo no laboratório. Obrigada pelos tempos que convivemos juntos, pelas risadas, brincadeiras, por me ajudar na viagem para Boston, quando eu não sabia falar quase nada em inglês, la estava você para me ajudar. Muito sucesso na sua carreira, sei que ainda vou ouvir muito sobre sua competência.

À **Janaína**, minha companheira de mestrado. Entramos juntas nessa jornada, e aqui estamos, na reta final desta etapa de nossas vidas. Durante esses dois anos, nasceu uma amizade entre nós, por meios de altas risadas, brincadeiras, lanches, choros, desespero, sempre uma ajudando a outra quando mais precisava. Quantas histórias que demos risada, desde a bota de 500 dólares, até histórias de cantores sertanejos. Muitos risos, muitas brincadeiras, muitas palhaçadas, o que tornava essa jornada mais prazerosa de lidar. Mas também não era só brincadeiras, tinha também o companheirismo nas clínicas quando fazíamos dupla, e sempre que precisei de ajuda com algo. Obrigada por sempre me ajudar quando precisei, pelos conselhos que me deu ao longo dessa jornada, por tentar me acalmar quando mais precisava. Obrigada por ser essa companheira que você foi durante esses dois anos. E pode ter certeza, que torço muito pelo seu sucesso, e sei que vai alcançar todos os seus sonhos e objetivos.

Às demais Brisetas **Úrsula**, **Sandra** e a mais nova no grupo a **Morgana**, obrigada pelo carinho que vocês tem por mim, e saibam que todo o carinho, e todo o sentimento é recíproco. Obrigada por estarem sempre do meu lado, me dando forças quando precisei. Serei eternamente grata. E força, que vamos conviver muito tempo juntas ainda rsrs.

À minha amiga **Francine** que me ajudou desde o começo do meu mestrado. Fran, obrigada por ser paciente comigo, me ensinando tudo do meu projeto, desde a parte de realizar o clareamento nos animais, até a confecção das lâminas. Você sempre esteve presente em tudo, todas as etapas, sempre me ajudando, tendo idéias novas, parcerias em projetos novos. Mas não tenho que te agradecer apenas por ser um anjo na minha vida de mestrado, mas também pela amizade que conquistei com você. Você é aquela amiga que sei que posso contar tudo,



Agradecimentos

desabafar de tudo, que não vai me julgar com minhas loucuras e paranoias. Me identifiquei muito com você, você é aquele tipo de pessoa que me espelha muito com sua força de vontade, sempre prestativa e pronta para ajudar qualquer um em qualquer coisa, simpática, sempre alegre e dando risada, não tem tempo ruim, super ativa. Se precisava ficar no laboratório até madrugada comigo, ficava sem problemas e nem questionava, pelo contrário, achava engraçado. Obrigada Fran pelos ensinamentos, companheirismo, amizade, e espero que nossos planos deem certo.

*Às demais Lucianetes **Renata** e **Luciana** obrigada pelo convívio durante esses anos no departamento, pela amizade e por me ajudar quando precisei.*

*Ao **Diego Valentim** (vulgo Inutil) obrigada pelas parcerias, pelas risadas no laboratório, e pela sua amizade, sempre muito atencioso e prestativo, o inútil mais útil que já conheci. Obrigada por todos esses anos convividos no departamento.*

*À Paulete **Mariana** pelo convívio durante esses dois anos, pelas loucuras, pelas risadas e pelas histórias que compartilhamos durante esse tempo. Com certeza você tem grande responsabilidade por tornar esse curso mais agradável e animador. Obrigada por toda ajuda, por toda conversa. E agradecer também as mais novas Pauletes **Bruna** e **Ana Tereza** obrigada pelo convívio destes últimos tempos. Brunna com toda a sua delicadeza e compreensão sempre mostrou ser competente com tudo o que faz, e a Ana por toda risada, palhaçada e gargalhada que você me proporcionou. Obrigada por entrarem na minha vida. Ao **Enrico**, também orientado do Prof. Paulinho, que sempre se mostrou competente em tudo o que faz, com certeza terá muito sucesso na sua caminhada.*

*Às mais novas mestrandas da Endodontia **Vanessa** e **Letícia**. Meninas conheço vocês à tão pouco tempo, mas não precisa de muita conversa para começar a gostar de vocês. Duas meninas meigas, simpáticas e muito animadas. Sejam bem-vindas à esse mundo de Pós-graduação, façam bom proveito, e o que precisarem podem contar sempre comigo. Adorei*



Agradecimentos

conhecer vocês duas, e espero q nossa amizade fique cada vez mais forte, afinal sou 50% Endodontia e 50% Dentística, então vamos conviver por mais alguns anos. Beijós.

*À minha amiga doutoranda **Laura** (vulgo Laurete), uma pessoa ímpar, uma amizade que tenho desde quando eu era da graduação e acabou se fortalecendo no curso de pós-graduação. Posso sim considerar você como minha irmã de Pós, não me canso de te falar como gosto de você, e que ainda bem que você esteve comigo durante todo esse tempo, sempre me ajudando, dando risada e também me dando broncas quando precisava. Tenho uma admiração tão grande por você, e pela sua família, que até me sinto super a vontade quando estou perto de vocês. Você é uma pessoa sincera, leal, com princípios na vida, com algumas tubulações no caminho, mas sempre sai de cabeça erguida. Tenho grande admiração por você, pelo que você é, pela guerreira que você é. Obrigada pelo companheirismo, por essa amizade verdadeira, uma amizade que tenho certeza que sempre vou poder contar. Precisaria te agradecer por tanta coisa, tantos momentos que passamos juntos, tantos conselhos que você me deu, tantas broncas construtivas, tantas tapas na minha mão, que me falta palavras para expressar o que sinto por você. Obrigada por ser essa amiga tão especial, que fez meus dias mais fáceis de lidar e mais felizes. Conte comigo para tudo o que precisar, para chorar, dar risada, se divertir.*

*Ao meu amigo **Fábio** (vulgo Fabim) uma pessoa irritante mas que amo ter por perto. Brincadeiras à parte. Fabim obrigada por sempre estar ali quando precisei de alguns conselhos, mesmo que fosse para chorar e me desabafar. Tenho tanto que te agradecer, pelos ensinamentos, pela amizade, pelas orientações nos casos. Certamente meu mestrado não seria o mesmo sem você ali. Obrigada por sempre me dar calma durante minhas apresentações, e nunca esquecerei da posição de “mulher-maravilha”. Você além de ser um excelente clínico, vai ser um professor brilhante. Te admiro demais pela sua capacidade, experiência e companheirismo. Você certamente fará muita falta quando finalizar o doutorado. Um amigo que Deus me deu, e não abro mão nunca mais. Obrigada por sempre estar presente, e me defendendo. Obrigada pela sua amizade, carinho e toda sinceridade.*

*Ao meu amigo **Lucas** (vulgo Lusca, Best, Doc). Sim, você aparece de novo nos meus agradecimentos, porque além de ser minha banca (banca mais que especial) é um amigo que*



Agradecimentos

me acompanhou desde o meu início no departamento. Cheguei no departamento, toda tímida, não conhecia ninguém, até que um dia começamos a brincar, eu você e a Fer e vi o quanto você era gente boa. Foi no meu mestrado que nos aproximamos mais e vi que além de ser gente boa, você é um excelente profissional, tem capacidade, e que com certeza vai vencer muito na vida ainda. Não é à toa que digo isso, porque no Primeiro concurso que você prestou, passou logo de cara. Sempre acreditei no seu potencial, e sei que você vai muito longe ainda. Obrigada por sempre me ajudar no laboratório, pelas risadas, pelos churrascos maravilhosos sempre explodindo, por ser tão sincero, por ser tão você. Você faz muita falta aqui em Araçatuba, isso pode ter certeza, cadê as histórias dos cantores sertanejos? Sensacional. Risada com você sempre era garantida. Você tem um futuro brilhante pela frente, e o que eu puder ajudar de alguma forma, saiba que pode contar comigo e tem sempre o meu apoio. Obrigada pela amizade e todo o conhecimento que você compartilhou comigo durante esse tempo. A odontologia brasileira tem muito a ganhar com você ainda.

Aos estagiários da Dentística **Lívia, Natí, Ana Carol, Karina, Érika Chiba, Caio Pavani, Gabriel Secamilli, Morgana**, agradeço pelos dias convvidos juntos. Desejo todo o sucesso para vocês, e que esse tempo que passarem no departamento possa ser muito produtivo, e o que precisarem sempre estarei lá para ajudar no que for possível.

Ao meu amigo **Carlos** (vulgo Charles e/ou Bueno) e sua noiva **Vanessa** (vulgo Tchula). Esse casal fantástico e super animado. Me aproximei a pouco tempo de vocês, mas já se tornaram muito especiais. Casal sempre animado, que topa tudo. Obrigado por proporcionar momentos de alegrias, e com muitas risadas. Desejo muita felicidade ao casal.

À minha eterna companheira de laboratório **Fernandinha** meus eternos agradecimentos pelo companheirismo durante toda a graduação na iniciação científica e no próprio curso. Sinto uma saudade enorme de você no meu dia-a-dia, das broncas para comer menos, no estímulo no laboratório, na amizade sincera que tinha com você, nos conselhos, na ajuda em tudo. Amo você Ferdinanda, e saiba que estou com você pra tudo, posso não estar perto, mas sempre estarei com você em pensamento. A admiração que tenho por você é tão grande. Admiro sua garra, sua vontade pela vida, sua perseverança, por ser essa pessoa guerreira que você é,

Marjorie de Oliveira Gallinari



Agradecimentos

continue com esse perfil de sargentinha que você tem, que você vai longe. Sempre estarei torcendo por você, pela sua felicidade e pelo seu sucesso. E sempre tenha muita fé, porque só Ele é capaz de proporcionar milagres em nossas vidas, e na sua Ele está atuando com muito carinho. Amo você guria.

*À minha amiga **Bruninha**. Meu Deus, não sei nem o que falar! São tantas coisas que vivemos juntas, tantas histórias, que não sei nem por onde começar te agradecer. Te agradecer basicamente pela sua amizade, por sempre me apoiar, me dar os melhores conselhos, por sempre estar presente em tudo que tenho vivido nos últimos anos. Acabava deixando você louca com meus problemas do mestrado, desabafando tudo para você, e você tentava me ajudar, oferecia ajuda nos meus experimentos, são poucos que fazem isso, e te admiro muito por isso, e por sua vontade de viver, pela sua garra, pela sua sinceridade. Pode contar sempre comigo, para qualquer coisa. Beijos no coração!*

*À minha amiga **Natália Conti** que sempre esteve comigo durante esse tempo de mestrado. Nossa amizade começou através de uma orientação de iniciação científica. Você chegou pedindo estágio pro professor, e ele preocupado se você tinha algum problema comigo haha. Quando você começou, você chegou devagarzinho na minha vida, e ficou para sempre. Você é aquele tipo de amiga companheira, fiel, leal, e super animada. Essa nossa amizade, foi além da faculdade, e formando as “Jamaras”, nossas reuniões de quarta-feira, onde explorava nossos dotes culinários, regada com muita risada e vinho. Obrigada por todos os conselhos, todas as risadas, todas as conversas. Continue sendo essa pessoa maravilhosa e doida que você. Amo você e sinto muito a sua falta todos os dias, com toda a sua contribuição para o departamento. Obrigada por ser quem é, e pela amizade e carinho e sempre me dando apoio durante todo esse tempo.*

*Àos meus amigos do **Clubinho** (**Coró, Clicia, Alana, Mari, Gustavo, Aline e Jamille**), meus amores que sempre me apoiaram e me deram força em tudo durante toda a graduação, e mesmo depois. A saudade que tenho de vocês é tão grande, que não cabe mais dentro de mim. Sinto uma admiração e um carinho enorme por vocês, essa alegria de vocês que contagiam todos ao redor, cativam todos com essa simpatia e alegria de vocês. Amo ter vocês como*



Agradecimentos

amigos, poder contar com vocês para qualquer coisa me dá um alívio no peito. Não tenho palavras para agradecer o companheirismo de vocês. Ao mesmo tempo que estamos longes umas das outras, estamos perto (santo WhatsApp). Amo ter vocês como amigos, sempre levarei vocês comigo para onde eu for. Minha amizade com vocês sempre será a mesma. Amo muito, e obrigada sempre pelo apoio que vocês me dão em tudo. Beijo grande.

À **Mah Hildebrand**, uma menina de um coração enorme, maravilhosa, e sempre esteve por perto torcendo e me dando apoio. Obrigada por todo o companheirismo que tivemos durante a graduação, o estágio, e mesmo que nos distanciamos depois de formadas, saiba que tenho enorme admiração por ti, e sempre estarei torcendo por você. Beijo grande.

À turma mais linda e animada da universidade **Turma X**, turma que passei grudada todos os dias durante seis anos na graduação. Tenho saudades do nosso convívio até das brigas bestas que tínhamos. Turma que vai ficar pra história e permanecerá eternamente no meu coração. Tenho orgulho de falar aos quatro cantos do mundo: Fiz parte da TURMA X da FOA, meu eterno orgulho e saudade.

Aos meus amigos de infância **Daniel, Priscila e Miriam**. Como agradecer aqueles amigos que são tipo irmãos? Não sei nem por onde começar, amizade de longa data, uma média de 20 anos de amizade, são poucos que mantêm. Nossa amizade vai ser eterna, podemos ficar meses sem se falar, mas quando nos encontramos parece que nos vimos ontem, e não paramos de conversar um minuto, até esquecemos da comida quando saímos para jantar, de tanta conversa rs. Meus irmãos, como amo ter vocês por perto, como amo ter vocês como amigos. Obrigada por existirem, por ser essas pessoas maravilhosas, por dentro e por fora.

Aos meus amigos de Guararapes **Caio, Juninho, Rogério e Camila** que me proporcionaram momentos maravilhosos e cheios de gargalhadas. Não existe um grupo de amigos mais engraçados do que vocês, impossível ficar meia hora com vocês sem dar risada. A cumplicidade, companheirismo que adquiri com a amizade de vocês é grande. Sinto um



Agradecimentos

carinho enorme por vocês. Obrigada por estarem presentes durante esses dois anos de mestrado e por sempre torcerem por mim.

*À **Turma 59** que me acolheu com tanto carinho, sendo a primeira turma que fiz monitoria, começando pela Dentística I e em seguida a Dentística II. Além de poder passar um pouco do que sei, fiz muitas amizades, e amizades que levarei para vida. Essa turma se tornou muito especial, e sempre terei grande admiração e carinho por todos vocês. Torço muito pelo sucesso de todos e que alcancem todos os objetivos. Obrigada por dar sentido à minha escolha de vida, vocês fizeram esses meus dois anos de mestrado valerem à pena. Guardarei vocês eternamente no meu coração. Um agradecimento dessa turma especial para **Murilo** (vulgo Xará), **Murilo** (vulgo Cestari), **Vitor** (vulgo Panda), **Aninha**, **Amanda**, **Anna Clara**, **Hugo** e **Victor**. Sassinhora hein, que amizade é essa gente? Chegaram de mansinho, mas chegaram para ficar. Quantas risadas, quantas alegrias e quantas histórias em pouco tempo de amizade. Obrigada pelo carinho, pela atenção e pelo companheirismo, com vocês sempre vai ser risada garantida. Quantos momentos maravilhosos e distraídos passei com vocês, certamente farão muita falta e deixarão muita saudade quando forem embora e seguir a vida de vocês. Contem comigo para qualquer coisa, e sempre que precisarem de algo, gritem que irei correndo!*

*À **Turma XIV** que também me acolheu com muito carinho, a primeira turma da graduação que dei aula teórica, jamais esquecerei deste momento e de vocês. Obrigada por sempre acreditar em mim e no meu potencial. Toda clínica do noturno era uma alegria, e ia sem hesitar, passar algumas horinhas com vocês fazia meu dia bem melhor. Obrigada pelo carinho e pelas risadas.*

*À minha turma de InterUnesp **Amanda**, **Murilo** e **Nati Gimenez**. Em tão pouco tempo que conheço você, já sinto um carinho muito grande por vocês. Obrigada por alegrarem meus dias, por me incentivarem, por me ajudar sempre que precisei, afinal: “Cadê aquela guerreira?”. Vocês são demais. Amo muito vocês.*



Agradecimentos

Ao meus amigos de pós-graduação **Cleidiel**, passamos por tanto aperto juntos como loucuras que o mestrado causa, o estresse para conseguir a nota do TOEIC, fazendo curso intenso de inglês, treinando, ajudando um ao outro, nas conversas, nos exercícios, até para tirar o estresse e cansaço mental. Você foi tipo irmão para mim na pós, sempre me ajudando com palavras de conforto, ajudando no que era preciso, seminários juntos. Você é uma pessoa muito competente e ágil, quem não te conhece logo de cara já percebe que você será uma pessoa de muito sucesso na sua vida. Saiba que sempre estarei aqui torcendo por você, pela sua felicidade, e pelo seu sucesso. Obrigada por existir e por ser essa pessoa maravilhosa que você é. E vamo entrar de cabeça no doutorado.

Ao grupo de amigos mais animados **Guilherme, Rafael** (vulgo Shane), **Lucas** (vulgo Make), **Renato, Gestter** (vulgo Ché) e **César** não existe grupo mais ousado e alegre do que vocês. Obrigada por estar presente nesses dois anos de mestrado, proporcionando momentos maravilhosos e de muita risada e companheirismo. Obrigada por existirem, obrigada pelos momentos de ousadia e alegria. Não posso deixar de agradecer os bixos **Lucas** (vulgo Nutella) e **Vitor Scalet**, por fazerem parte da minha vida nesses últimos anos, gosto muito de vocês, e me aguardem na dentística rsrs. “Quem não tem amigo não tem nada!”

À Família

Aos meus **18 tios e tias**, obrigada por ser essa família linda e maravilhosa que tanto amo, e que sempre me apoia nas minhas escolhas e torcem pelo meu sucesso sempre. Em especial para **Tia Lucia, Tio Elmo, Tia Eny, Tio Valdomiro, Tio Enio, Tia Vanda, Tio Edinho, Tio Elvis** que são os tios que mais tenho contato, obrigada por sempre estarem presente em todos os momentos da minha vida e por partilhar de todas as minhas alegrias e conquistas. Obrigada por sempre torcerem por mim, e me apoiarem. Obrigada por serem meus tios queridos. Amo todos vocês.

Aos meus **24 primos e primas**, obrigada por ser minha família, e me apoiarem sempre que preciso. Obrigada por toda a palhaçada que passamos juntos. Um agradecimento especial para **Murilo, Danilo, Jorge Luiz, Poliane, Gusavo, Juliana Paes, Pamela, Luenia, Alanis,**

Marjorie de Oliveira Gallinari

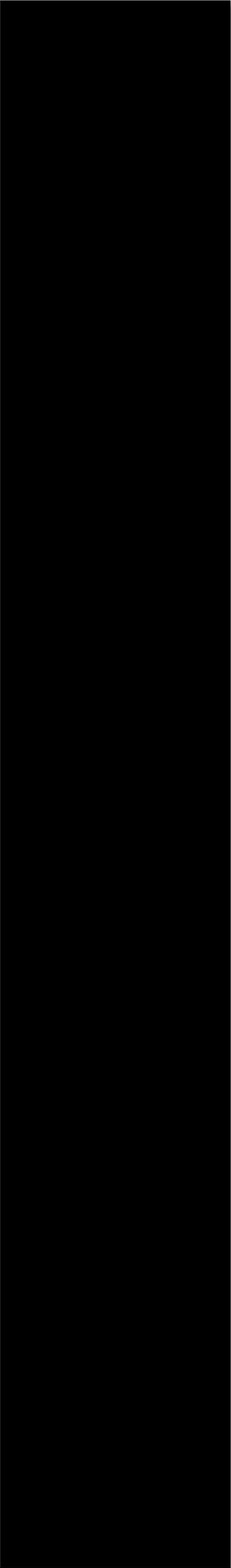


Agradecimentos

Lucas Gallinari, Juliana Gallinari que foram os primos que mais tive contato, obrigada por serem tão próximos, por todas as brincadeiras de quando éramos crianças, alguns vejo com mais frequência do que os demais, mas meu sentimento por vocês é muito grande. Amo vocês e morro de saudade sempre.

*À minha tia de coração **Tuca** e à minha irmã de coração **Amanda**, sinto tanta admiração e consideração por vocês, duas pessoas maravilhosas, de um coração enorme. Desde criança me acompanhando, todos os meus passos, minhas vitórias e conquistas, sempre me parabenizando e compartilhando da minha felicidade. Amo muito vocês, sempre levarei no meu coração para onde eu for. Não posso deixar de agradecer ao tio **Usan**, porque se não fosse seus conselhos, suas conversas, com certeza hoje não estaria aqui, não chegaria onde cheguei. Por toda força e apoio que me deu quando quis abandonar a faculdade. Devo muito à vocês. Meus sinceros agradecimentos e meu eterno carinho por vocês.*



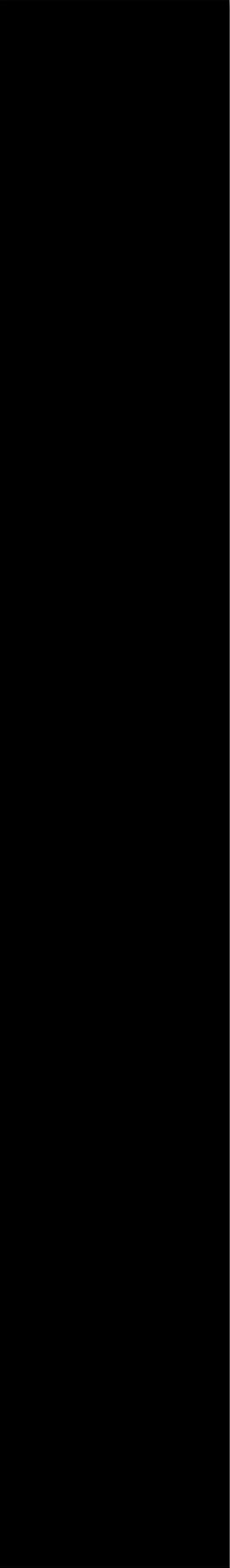


Epigrafe

“A mente que se abre a uma nova ideia, jamais voltará
ao seu tamanho original.”

Albert Einstein





Resumo

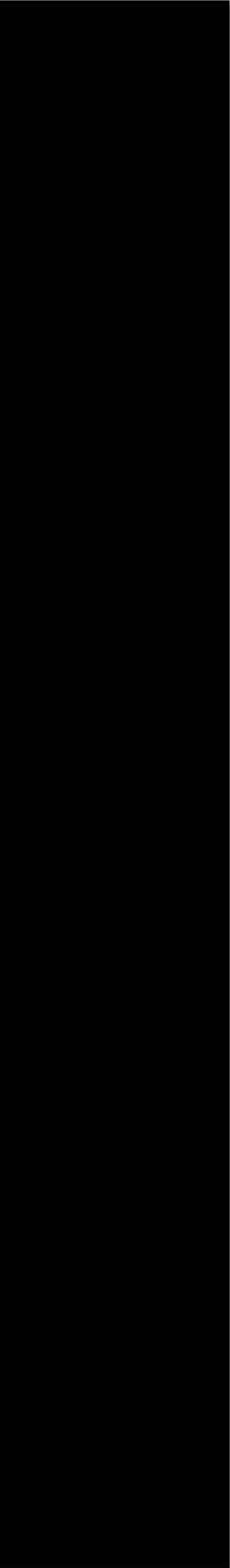
Gallinari MO. Influência do peróxido e do uso de diferentes substâncias de combate à dor na inflamação e na expressão de neuropeptídeos pró-inflamatórios após o tratamento clareador [dissertação]. Araçatuba: Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista; 2016

Resumo

O objetivo do presente estudo foi avaliar a influência do Otosporin® e do Tylenol® na inflamação e na expressão de neuropeptídeos por meio da análise histopatológica e imunoistoquímica. Para tanto, 63 ratos foram divididos em 3 lotes de estudo (n=21) de acordo com a terapia de combate à dor: LI- controle, LII- administração tópica de Otosporin® por 10 minutos, depois do tratamento clareador e LIII- administração via oral de Tylenol® 30 minutos antes do tratamento clareador com peróxido de hidrogênio a 35% e depois de 12 em 12 horas. Em todos os grupos de estudo, na maxila esquerda foi realizado o tratamento clareador placebo e a maxila direita recebeu a 3 aplicações de 15 minutos de um gel clareador a base de peróxido de hidrogênio a 35%, totalizando 45 minutos de contato do gel clareador com substrato dentário. Os momentos de eutanásia dos animais foram imediatamente após, 24 e 48 horas após o tratamento clareador. Posteriormente à eutanásia dos animais, as peças foram processadas e o primeiro molar de cada maxila foi analisado histopatologicamente quanto ao grau de inflamação e por análise de imunoistoquímica para verificarmos a presença dos neuropeptídeos SP e CGRP. Os dados obtidos foram submetidos ao teste estatístico não paramétrico Kruskal Wallis seguido do teste de Dunn para comparações individuais, sendo observado na análise histopatológica total desorganização celular, extensas áreas de necrose nos grupos clareados, e o grupo que recebeu tratamento com Otosporin® apresentou melhores resultados. Na análise imuno-histoquímica, obteve imunomarcagem positiva em todos os grupos, inclusive controle, porém nos grupos clareados a imunomarcagem foi mais forte, sendo que o grupo que recebeu tratamento com Otosporin® apresentou os melhores resultados. Conclui-se que o uso do Otosporin® após tratamento clareador minimiza os efeitos colaterais deste procedimento estético.

Palavras-chave: *Clareamento dental. Inflamação. Hidrocortisona. Acetaminofeno. Substância P. CGRP*





Abstract

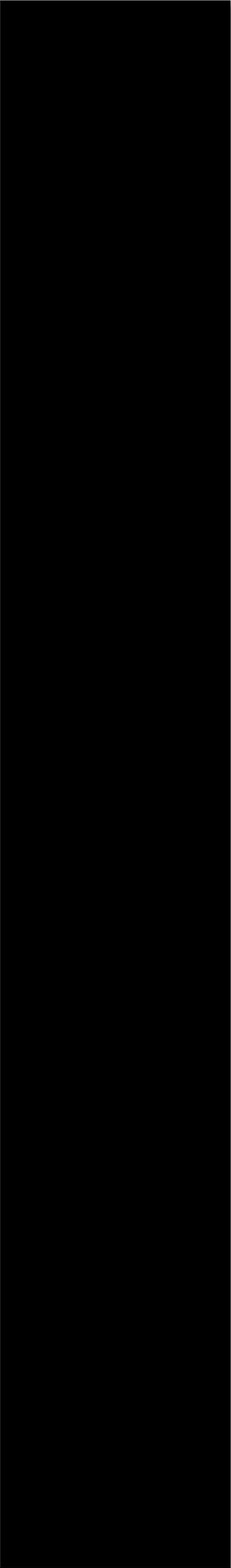
Gallinari MO. Influência do peróxido e do uso de diferentes substâncias de combate à dor na inflamação e na expressão de neuropeptídeos pró-inflamatórios após o tratamento clareador [dissertação]. Araçatuba: UNESP - São Paulo State University; 2016

Abstract

The aim of this study was to evaluate the influence of hydrocortisone and acetaminofen substances in inflammation and neuropeptide expression by histopathologic and immunohistochemical analysis. For this, 63 rats were divided into 3 batches of study (n = 21) according to combat pain therapy: Li control LII- topical administration of Otosporin® for 10 minutes after the bleaching treatment and administration route LIII- oral Tylenol® 30 minutes before the bleaching with hydrogen peroxide at 35% and then 12 for 12 hours. In all study groups in left maxilla was performed treatment whitener placebo and right jaw received three applications of 15 minutes a whitening gel 35% hydrogen peroxide base, totaling 45 minutes of contact of the whitening gel dental substrate. The times of the animals were euthanized immediately after 24 and 48 hours after the bleaching treatment. After the euthanasia of animals, the pieces were processed and the first molar of each jaw was analyzed histologically the degree of inflammation and analysis of immunohistochemistry to verify the presence of the neuropeptides SP and CGRP. The data were submitted to statistical nonparametric Kruskal Wallis test followed by Dunn's test for individual comparisons, being observed on histopathologic total cellular disorganization analysis, extensive areas of necrosis in whitened groups, and the group that received treatment with Otosporin® showed better results. In immunohistochemical analysis, obtained positive immunostaining in all groups, including control, but the whitened immunostaining groups was stronger, and the group that received treatment with Otosporin® showed the best results. We conclude that the use of Otosporin® after bleaching treatment minimizes the side effects of this cosmetic procedure.

Palavras-chave: *Dental Bleaching. Pulpit. Hydrocortisone. Acetaminophen. SP. CGRP.*





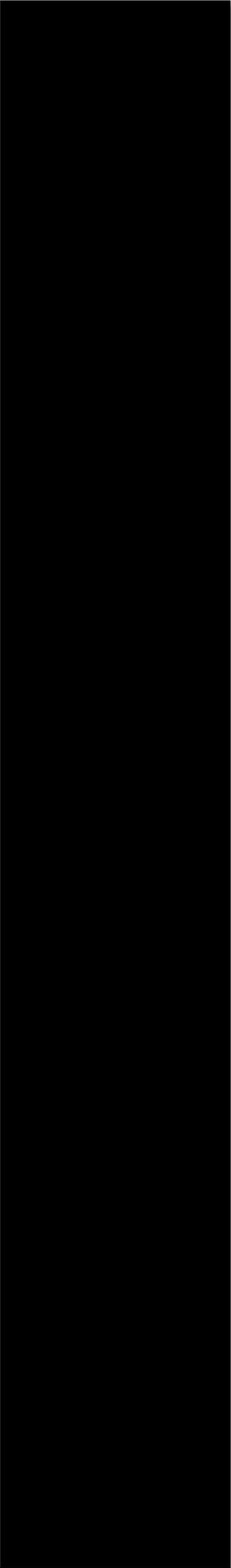
Lista de

Quadros

Quadro 1 - Distribuição dos grupos experimentais de acordo com a terapia de combate à dor, tempos de análise e local do tratamento.

45





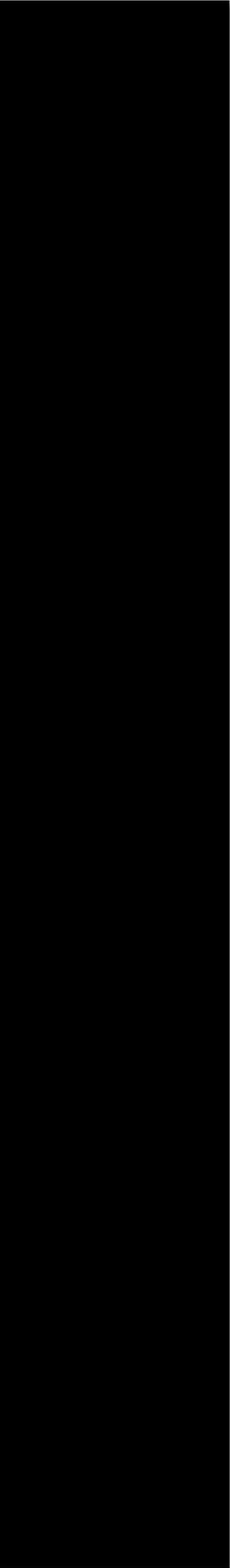
Lista de

Tabelas

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Medianas de escores atribuídos na análise histológica em cada terço coronário e radicular para todos os grupos controles.	53
Tabela 2 - Medianas de escores atribuídos na análise histológica de cada terço coronário, para todos os grupos clareados.	54
Tabela 3 - Medianas de escores atribuídos na análise histológica em cada terço radicular para todos os grupos estudados.	58
Tabela 4 - Medianas de escores atribuídos à imunomarcção da SP em cada terço coronário e radicular para todos os grupos controles.	59
Tabela 5 - Medianas de escores atribuídos à imunomarcção da CGRP em cada terço coronário e radicular para todos os grupos controles.	59
Tabela 6 - Medianas de escores atribuídos à imunomarcção da SP em cada terço coronário para todos os grupos estudados.	60
Tabela 7 - Medianas de escores atribuídos à imunomarcção da SP em cada terço radicular para todos os grupos estudados.	61
Tabela 8 - Medianas de escores atribuídos à imunomarcção da CGRP em cada terço coronário para todos os grupos estudados.	64
Tabela 9 - Medianas de escores atribuídos à imunomarcção da CGRP em cada terço radicular para todos os grupos estudados.	65



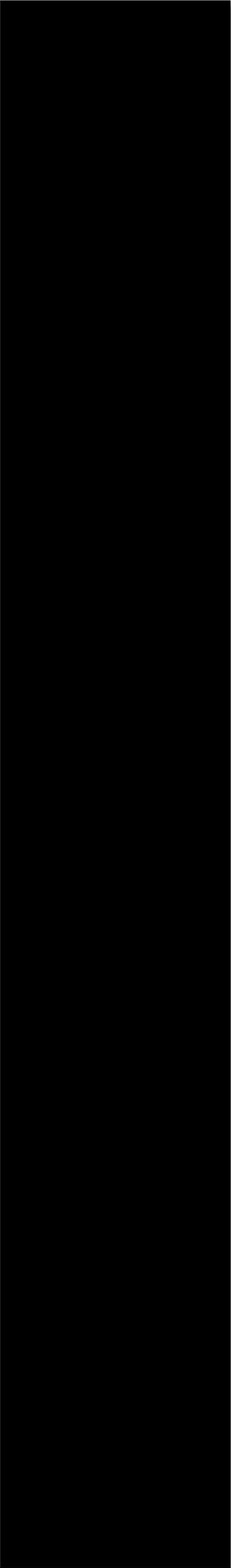


Lista de

Figuras

- Figura 1** - Corte longitudinal dos terços coronários do tecido pulpar dos grupos de estudo, no tempo imediato. Lâminas coradas por H.E. e observadas em Microscopia Óptica Comum (400x). 51
- Figura 2** - Corte longitudinal dos terços coronários do tecido pulpar dos grupos de estudo, no tempo 24 horas após o clareamento. Lâminas coradas por H.E. e observadas em Microscopia Óptica Comum (400x). 56
- Figura 3** - Corte longitudinal dos terços coronários do tecido pulpar dos grupos de estudo, no tempo 48 horas após o clareamento. Lâminas coradas por H.E. e observadas em Microscopia Óptica Comum (400x). 57
- Figura 4** - Corte longitudinal do terço coronário da porção radicular do tecido pulpar dos grupos de estudo, nos diferentes tempos de análise. Lâminas coradas por H.E. e observadas em Microscopia Óptica Comum (400x). 58
- Figura 5** - Cortes histológicos apresentando o padrão de imunomarcção para SP. (1000x) 62
- Figura 6** - Cortes histológicos apresentando o padrão de imunomarcção para CGRP (1000x) 63

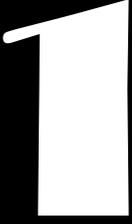




Sumário

1	Introdução	38
2	Objetivos	42
3	Material E Método	44
	3.1. Delineamento Experimental	45
	3.2. Animais	45
	3.3. Distribuição em Lotes Experimentais	45
	3.4. Protocolo Sedativo E Anestesia	46
	3.5. Divisão dos Grupos Experimentais	46
	3.6. Eutanásia e Obtenção Das Amostras	48
	3.7. Processamento Histológico	48
	3.8. Técnica Histológica	49
	3.9. Técnica de Imunoistoquímica Peroxidase	50
	3.10. Análise Histopatológica	50
	3.11. Análise Imunoistoquímica	51
	3.12. Análise Estatística	52
4	Resultados	53
	4.1. Análise histopatológica das porções coronária e radicular dos grupos controles	54
	4.2. Análise histopatológica da porção coronária dos grupos clareados	54
	4.3. Análise histológica da porção radicular	58
	4.4. Análise imunoistoquímica dos grupos controles	60
	4.5. Análise imunoistoquímica do marcador SP nos terços coronários dos grupos experimentais	60
	4.6. Análise imunoistoquímica do marcador CGRP nos terços coronários dos grupos experimentais	62
	4.7. Análise imunoistoquímica do marcador SP dos terços radiculares dos grupos experimentais	64
	4.8. Análise imunoistoquímica do marcador CGRP dos terços radiculares dos grupos experimentais	65
5	Discussão	69
6	Conclusão	76
7	Referências Bibliográficas	78
8	Anexos	85





Introdução

1 Introdução

A Odontologia contemporânea tem sido fortemente atingida por grande demanda estética, sendo o clareamento dental um dos procedimentos clínicos mais requeridos pelos pacientes. Este tratamento pode ser realizado pela técnica caseira, que se caracteriza pela exposição diária a peróxidos de baixa concentração (HAYWOOD; HEYMAN, 1991) ou pela técnica *in-office*, que utiliza peróxidos altamente concentrados nos elementos a serem clareados (WILLIAMS et al., 1992). Ambas as técnicas se baseiam na liberação de EROs (espécies reativas de oxigênio), que por serem extremamente instáveis reagem e clivam os agentes cromóforos presentes na estrutura dental, transformando-os em moléculas menores e tornando os dentes mais claros (PERDIGÃO, 2010; WILLIAMS et al., 1992).

No entanto, a ação dos EROs não se limita à oxidação dos agentes pigmentantes, não sendo raros os relatos de detecção de concentrações expressivas de peróxido na câmara pulpar, após a aplicação do gel clareador sobre o esmalte dental (SOARES et al., 2014a; BRISO et al., 2015a, 2015b). Este fato tem sido associado desde alterações morfológicas (CAVIEDES-BUCHELI et al., 2008a; SOARES et al., 2014a), diminuição da taxa de respiração mitocondrial de células odontoblastóides MDPC-23 (SOARES et al., 2014a, GONÇALVES et al., 2016), até a ocorrência de hipersensibilidade dentária e danos irreversíveis à polpa (SEALE et al., 1981; SEALE; WILSON, 1985; ANDERSON et al., 1999; COSTA et al., 2010; KINA et al., 2010).

Estudos *in vivo* em ratos confirmaram a presença de danos às células pulpares em animais que receberam o tratamento clareador, e que os tais danos foram proporcionais ao número de sessões de clareamento (CINTRA et al., 2013), ao tempo e à concentração do agente clareador (CINTRA et al., 2016a).

Sabe-se ainda que, a partir dos danos celulares causados pela penetração do H_2O_2 , ocorre a síntese e liberação de mediadores bioquímicos, como as prostaglandinas, histamina e bradicinina, envolvidos no processo inflamatório (CINTRA et al., 2016a; SOARES et al., 2014a). Estes mediadores provocam um aumento da permeabilidade vascular e vasodilatação dentro da cavidade pulpar (SOARES et al., 2014a). Vale ressaltar que qualquer aumento da pressão pulpar, estimula mecanicamente as fibras nervosas periféricas (PASHLEY, 2013; SOARES et al., 2014b, 2014c), que respondem com a produção e liberação de alguns



neurotransmissores da família dos peptídeos como, por exemplo, a substância P (SP) e o peptídeo relacionado geneticamente a calcitonina (CGRP) (BRAIN et al., 1985; CASASCO et al., 1990; WAKISAKA et al., 1990; CAVIEDES-BUCHELI et al., 2006, 2007, 2008a, 2008b). Estes neuropeptídios excitam os neurônios de transmissão, promovendo assim a deflagração de sinais de dor a partir da área de lesão tecidual. Este fenômeno resulta em relatos frequentes de desconforto e dor em pacientes submetidos ao tratamento clareador (ALMEIDA et al., 2012; DE ALMEIDA et al., 2012).

Contudo, a sensibilidade na maioria das vezes é avaliada de forma subjetiva, tornando-se difícil a investigação da eficácia e a comparação dos métodos de controle da dor. Assim, o estudo da quantidade da substância P e da CGRP pode acrescentar informações objetivas sobre o perfil da inflamação e, conseqüentemente, da dor durante o tratamento.

Na prática clínica, os métodos empregados para minimizar os efeitos clínicos da síntese destes mediadores são a administração oral ou tópica de fármacos e/ou emprego de agentes dessensibilizantes antes ou após o procedimento clareador (JORGENSEN; CARROL, 2002; CROLL, 2003; GINIGER et al., 2005; HAYWOOD et al., 2005; ARMÊNIO et al., 2008; TAY et al., 2009). Esses agentes dessensibilizantes podem possuir ambos os tipos de mecanismo de ação ou apenas um tipo, esses mecanismos podem ser por meio de ação física vendando os túbulos dentinários e também por meio da ação neural, bloqueando o estímulo nervoso (BASTING et al., 2012).

Dentre os agentes de aplicação tópica, pode ser utilizado também a hidrocortisona, um anti-inflamatório esteroidal, encontrado comercialmente com o nome de Otosporin®, associado com antibiótico sulfato de neomicina, teve seu uso consagrado na Odontologia como medicamento endodôntico, bem como para o tratamento da hipersensibilidade dentinária após a realizações de restaurações, possibilitando atenuar a intensidade da reação inflamatória e eliminar a dor pós-operatória, favorecendo a reparação tecidual (SOUZA et al., 1996; HOLLAND et al., 1991, 1998; SILVA et al., 2004; PANZARINI et al., 2008).

Por sua vez, o acetaminofeno é um anti-inflamatório não esteroidal (AINES) com propriedades analgésicas, atua na inibição da cascata do ácido araquidônico, impedindo a síntese de prostaglandinas, o que acarreta em redução da permeabilidade vascular e da dor (VIOLA, 2013). O fato do bloqueio ocorrer de maneira direta sobre uma variante da enzima ciclo-oxigenase (BOUTAUD et al., 2002;



SWIERKOSZ et al., 2002; ANDERSON, 2008), faz deste fármaco uma excelente escolha no combate à dor, apresentando reduzidos efeitos colaterais.

Diante dos danos pulpares relacionados com o tratamento clareador, bem como do reflexo clínico da sensibilidade dentária, considera-se pertinente estudar o efeito das terapias de combate à dor disponíveis atualmente na inflamação pulpar e na expressão dos neurotransmissores SP e CGRP no tecido pulpar. Estas informações poderão colaborar na determinação de novos parâmetros para realização do clareamento dental, visando o desenvolvimento de protocolos eficientes, com o mínimo de efeitos colaterais ligados à sensibilidade dentária e às alterações pulpares.



2

Objetivo

2 **Objetivo geral**

O objetivo do presente estudo será verificar a influência de terapias de combate à dor na inflamação e na expressão de neuropeptídeos pró-inflamatórios, após o tratamento clareador realizado com peróxido de alta concentração.

2.1. Objetivos específicos

- a) Avaliar, por meio da análise histopatológica, a estrutura e o padrão de celularidade do tecido pulpar de ratos wistar, sob influência do tratamento clareador e de terapias utilizadas no combate à dor;
- b) Avaliar, por meio de análise de imunoistoquímica, a influência do uso pré-operatório de anti-inflamatórios e analgésicos sobre a expressão de SP e CGRP;
- c) Avaliar a influência do tempo após o clareamento na inflamação do tecido pulpar de ratos wistar e expressão de neuropeptídeos.

2.2. Hipóteses nulas:

- a) Os tratamentos de combate à dor não influenciariam na resposta histológica e no padrão de celularidade do tecido pulpar de ratos wistar, sob influência do tratamento clareador;
- b) Os tratamentos de combate à dor não influenciariam na expressão dos neuropeptídeos SP e CGRP;
- c) Os diversos tempos após o tratamento clareador não influenciariam no quadro inflamatório do tecido pulpar de ratos wistar, nem na expressão dos neuropeptídeos SP e CGRP.



3

Materiais e

Métodos

3 **Materiais e Métodos**

Anteriormente à realização desta pesquisa, o projeto foi submetido à Comissão de Ética em Pesquisa Animal (Processo nº2014-00817) e somente após sua aprovação foi iniciada a fase experimental.

3.1. Delineamento Experimental

O projeto apresentou 3 fatores em estudo: (1) tratamento clareador em 2 níveis (tratamento com gel placebo e tratamento clareador com peróxido de hidrogênio 35%); (2) tratamentos de combate à dor em 3 níveis (controle, aplicação tópica de Otoporin® e administração via oral de Tylenol®); (3) tempos de análise em 3 níveis (T0 – imediatamente após a sessão clareadora; T1 – 24 horas após a sessão clareadora; T2 – 48 horas após a sessão clareadora).

A amostragem foi de 63 ratos (n=7) e as variáveis de resposta foram a inflamação pulpar e a expressão de neuropeptídeos.

3.2. Animais

Foram utilizados 63 ratos machos (*Rattus albinus*, Wistar), pesando aproximadamente 250g, provenientes do biotério da Universidade Estadual Paulista (UNESP). Os animais foram mantidos em ambiente climatizado, com temperatura entre 22 e 24°C, com ciclo de luz controlada (12 horas claro e 12 horas escuro), permanecendo 4 ratos por gaiola. Os animais foram alimentados durante todo o período experimental com dieta sólida e água “ad libitum”.

3.3. Distribuição nos Lotes Experimentais

Os ratos foram distribuídos aleatoriamente em 3 lotes, de acordo com o tratamento de combate à dor, como mostrado no Quadro 1.

Quadro 1 – Distribuição dos lotes experimentais de acordo com o tratamento recebido, tempos de análise e local do tratamento.

LOTE	Tempos de Análise	Maxila direita	Maxila esquerda
------	-------------------	----------------	-----------------



1 Controle	Imediatamente após (n=7)	Peróxido de hidrogênio a 35%*	Gel placebo
	24 horas (n=7)		
	48 horas (n=7)		
2 Otosporin®	Imediatamente após (n=7)	Peróxido de hidrogênio a 35%* + Otosporin® **	Gel placebo + Otosporin®
	24 horas (n=7)		
	48 horas (n=7)		
3 Tylenol®	Imediatamente após (n=7)	Peróxido de hidrogênio a 35% + Tylenol® †	Gel placebo + Tylenol®
	24 horas (n=7)		
	48 horas (n=7)		

*FGM Produtos Odontológicos, Santa Catarina, Brasil

** Laboratório Farmoquímica, Rio de Janeiro, Brasil

† Janssen-cilag Farmacêutica Ltda., São Paulo, Brasil

3.4. Protocolo Sedativo e Anestesia

Após divisão aleatória dos animais, os pertencentes aos **Lotes I e II** receberam, via intramuscular, uma associação do sedativo Cloridrato de Xilazina (Dopaser, Calier S.A., Barcelona, Espanha) na dosagem de 10 mg/kg e cloridrato de ketamina (Vetanarcol, König S.A – Avellaneda, Argentina), na dosagem 25 mg/Kg, para causar efeito anestésico.

Nos animais do **Lote III**, o sedativo foi administrado 30 minutos após a administração do fármaco para combate à dor, ou seja, antes do tratamento clareador.

3.5. Divisão dos Grupos Experimentais

Grupo 1 – Antes da aplicação do gel placebo, uma resina polimerizável (Top Dam - FGM Produtos Odontológicos Ltda., Santa Catarina, Brasil) foi aplicada ao redor dos molares superiores, com intuito de proteger as estruturas circundantes do contato com o gel clareador. A barreira gengival foi fotoativada por 20 segundos, utilizando o fotopolimerizador de luz LED Rádi Cal (SDI Limited, Victoria, Austrália). Posteriormente, obteve-se o gel placebo por meio da mistura do agente espessante do produto Whiteness HP Maxx a 35% (FGM Produtos Odontológicos Ltda.) com água destilada, na mesma proporção do produto clareador original, ou seja 3 gotas de água



para 1 gota do espessante. O produto placebo foi aplicado na coroa exposta dos molares superiores esquerdo, permanecendo em contato com o esmalte por 15 minutos, sendo reaplicado 2 vezes, totalizando 45 minutos de contato com o esmalte dental.

Grupo 2 – Inicialmente foi aplicado a barreira gengival como descrito no grupo anterior. Posteriormente, o produto a base de peróxido de hidrogênio a 35%, Whiteness HP Maxx a 35% (Whiteness HP Maxx- FGM Produtos Odontológicos, Santa Catarina, Brasil) foi manipulado, segundo as recomendações do fabricante, ou seja, foram misturadas na proporção de 3 gotas peróxido para 1 gota do espessante. Imediatamente após, com auxílio de uma seringa graduada, foi aplicado aproximadamente 0,01 mL do produto sobre os molares da maxila direita, permanecendo em contato com o esmalte por 15 minutos. Em seguida, a superfície foi limpa com algodão, papel absorvente e água e realizou-se mais duas aplicações de 15 minutos, totalizando 45 minutos de contato do produto clareador com o esmalte dental.

Grupo 3 – Foram aplicados a barreira gengival e o gel placebo do mesmo modo que foi descrito para o G1 na maxila esquerda, no entanto, após a remoção do placebo, os molares receberam o produto a base de hidrocortisona e sulfato de neomicina (Otosporin®, Farmoquímica s/a, Rio de Janeiro, RJ), aplicado topicamente em seus molares superiores. Este permaneceu em contato com o esmalte, durante 10 minutos com o uso de algodão hidrófilo embebido com 3 gotas do Otosporin®.

Grupo 4 – As maxilas direitas do 2º lote foram submetidas ao tratamento clareador como descrito anteriormente no **G2**. Após o término, os molares receberam a aplicação tópica do Otosporin®, como descrito no **G3**.

Grupo 5 – Os animais receberam 30 minutos antes da aplicação do gel placebo, a solução de acetaminofeno. Para tanto, um comprimido de 500 mg de Tylenol® (Janssen-cilag Farmacêutica Ltda, São Paulo, SP) foi diluído em 100 mL de água destilada, sendo administrado, via oral (gavagem), na concentração de 40 mg/kg de peso corporal (FRACON et al., 2010). A administração foi realizada através de uma agulha de ponta romba e curva introduzida na boca do animal e gentilmente empurrado pelo esôfago até o estômago. Na sequência, foi aplicada a barreira gengival ao redor dos molares superiores que foram submetidos ao tratamento com o gel placebo, da mesma forma que descrito anteriormente. Posteriormente, os animais



mantiveram-se medicados com a solução de Tylenol®, mantendo a posologia de administração a cada 12h, até completar o tempo de eutanásia (24 horas e 48 horas).

Grupo 6 – Os ratos deste grupo receberam, 30 minutos antes do tratamento clareador, a solução de Tylenol® como descrito no **G5**. Em seguida, foi realizado a aplicação da barreira gengival e o tratamento clareador como descrito anteriormente. Após o término da sessão clareadora, a administração do Tylenol® foi retomada a cada 12 horas, até completar os tempos de análise de 24 e 48 horas.

3.6. Eutanásia E Obtenção Das Amostras

Após o tratamento clareador, os animais retornaram às gaiolas e foram mantidos nas condições descritas anteriormente. Cada lote de animal teve três tempos de eutanásia: imediatamente, 24h e 48h após as intervenções supracitadas. Para a eutanásia, os animais foram anestesiados como mencionado acima e submetidos à perfusão transcardíaca, iniciada com 100 ml de solução de cloreto de sódio 0,9%, seguida de 500 ml de solução fixadora constituída de 4% de formaldeído (Sigma-Aldrich, MO, Estados Unidos) e 3,8% de tetraborato de sódio (Sigma-Aldrich, MO, Estados Unidos) a 0,1 M, 4°C, pH 9,5. Em seguida, as maxilas foram cuidadosamente dissecadas.

3.7. Processamento Histológico

Após a dissecação, as maxilas foram mantidas na mesma solução fixadora por mais 8 horas, sendo em seguida lavadas em água corrente por 12h e, posteriormente, imersas em solução desmineralizadora de EDTA a 10% (Sigma-Aldrich, MO, Estados Unidos), renovada semanalmente, até não oferecer resistência à passagem de agulha nos tecidos, comprovando sua total desmineralização. Em média este momento foi alcançado após 90 dias do início da desmineralização.

Posteriormente, as maxilas desmineralizadas foram novamente lavadas em água corrente e sofreram desidratação em série gradativa de álcool etílico (70° - 80° - 95° - 100° - 100° - 100°) mantendo as maxilas imersas em cada solução por 1 hora. Em seguida, foram diafanizadas em xilol e, finalmente, as peças foram impregnadas e incluídas em parafina. A correta orientação da peça no momento da inclusão permitiu a realização de cortes histológicos realizados no sentido mesio-distal, de



forma que abrangessem os molares superiores e suas estruturas de suporte no sentido longitudinal.

A microtomia foi realizada em micrótomo de tecido mole (Leica Microsystems - RM 2045, Wetzlar, Germany), resultando em cortes seriados com 6 μm de espessura, os quais foram coletados em lâminas silanizadas (Starfrost, Knittel-gläser, Braunschweig, Alemanha). Conforme os cortes foram sendo obtidos, foram distribuídos, sendo um destinado para análise histológica, seguido de dois cortes destinados à análise imunoistoquímica. Assim, foram obtidos 12 cortes de cada peça, sendo 4 destinados à análise histopatológica, empregando a coloração pelo método da Hematoxilina e Eosina (LILLIE, 1954), e o restante destinado ao processamento imunoistoquímico.

3.8. Técnica Histológica

Os 336 cortes destinados à coloração H.E. foram desparafinizados em xilol e hidratados em série decrescente de etanol (100° - 95° - 70°). Em seguida, os cortes foram imersos em solução de hematoxilina por 7 minutos, seguida da lavagem com água corrente por 1 minuto. Depois foram mergulhados em álcool-ácido por 2 segundos, e lavados em água corrente por 5 minutos. Após a coloração com hematoxilina, os cortes foram imersos em solução de eosina por 4 minutos, sendo em seguida realizado a desidratação com álcool com concentração crescente (95° - 95° - 100° - 100°). Finalmente foram realizadas duas lavagens em Xilol. Todo esse processo foi realizado por uma máquina de coloração automatizada (Leica Microsystems - ST5010 Autostainer XL, Wetzlar, Germany).

3.9. Técnica da Imunoperoxidase Indireta

Os 672 cortes histológicos foram desparafinizados em xilol e hidratados em série decrescente de etanol (100°- 100°- 100°- 90°- 70° GL), permanecendo dois minutos em cada solução. A recuperação antigênica foi realizada por meio da imersão das lâminas histológicas em tampão *Diva Decloaker*® (Biocare Medical, CA, USA), em câmara pressurizada *Decloaking Chamber*® (Biocare Medical, CA, USA), a 95°C, por 10 minutos. Entre cada uma das etapas da reação imunoistoquímica foram feitas lavagens em tampão fosfato salino (PBS) 0,1M, pH 7,4. As secções histológicas foram



imersas em solução de 3% de peróxido de hidrogênio por 1 hora e 1% de soro albumina bovino por 12 horas, para o bloqueio da peroxidase endógena e o bloqueio dos sítios inespecíficos, respectivamente.

Em seguida, as lâminas histológicas foram divididas, de acordo com as marcações a serem realizadas com os neuropeptídios SP e CGRP. Posteriormente, foi feita a incubação, durante 24 horas, com um dos seguintes anticorpos primários: anti-SP (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) ou anti-CGRP (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA). Os anticorpos primários foram diluídos em Dako Antibody Diluent® (Dako Laboratories, CA, USA). Nas etapas subsequentes se empregou o Universal Dako Labeled (HRP) Streptavidin-Biotin Kit® (Dako Laboratories, CA, USA).

As secções histológicas foram incubadas no anticorpo secundário biotilado, durante 2 horas, e tratadas com estreptavidina conjugada com a peroxidase da raiz forte (HRP), por 1 hora. Na revelação se utilizou como cromógeno o 3,3'-tetracloridrato de diaminobenzidina (DAB chromogen Kit®, Dako Laboratories, CA, USA). Os cortes histológicos foram protegidos com meio de montagem e lamínula de vidro. Como controle negativo, os espécimes foram submetidos aos procedimentos descritos anteriormente suprimindo-se a utilização dos anticorpos primários.

3.10. Análise Histopatológica

As preparações histológicas foram observadas em microscópio óptico (Leica Microsystems – DM 4000 B, Wetzlar, Germany) em aumentos de 400x. Foram utilizados 4 cortes histológicos equidistantes da polpa dentária do primeiro molar superior. A análise histológica foi realizada qualitativamente por meio de escores atribuídos nos terços da polpa coronária (oclusal, médio e cervical) e radicular (coronário, médio e apical), sendo que:

Escore 1 – Atribuídos às regiões com ausência de células inflamatórias ou em número desprezível;

Escore 2 – Atribuídos às regiões com infiltrado inflamatório discreto caracterizado pela presença de poucas células inflamatórias;

Escore 3 – Atribuídos às regiões com infiltrado inflamatório moderado caracterizado pela presença de uma quantidade moderada de células inflamatórias;

Escore 4 – Atribuídos às regiões com infiltrado inflamatório severo, caracterizado pela presença de grandes quantidades de células inflamatórias;



Score 5 – Atribuídos às regiões com presença de áreas de necrose e ausência de qualquer tipo de células

Os escores utilizados neste estudo foram baseados nos escores utilizados por Cintra et al. (2013a), porém modificados adicionando o escore separado para o parâmetro de necrose tecidual.

3.11. Análise Imunoistoquímica

As preparações histológicas foram observadas em microscópio óptico (Optiphot-2, Nikon, Japão) em aumentos de 1000X, por um avaliador que desconhecia os grupos experimentais que estavam sendo analisados. A imunomarcagem foi definida como aquela de coloração acastanhada presente em células, em fibras nervosas e na matriz extracelular. Para cada marcador foram utilizados 4 cortes histológicos equidistantes da polpa dentária do primeiro molar superior. A análise imunoistoquímica foi realizada por terços da polpa coronária (oclusal, médio e cervical) e radiculares (coronário, médio e apical), sendo que:

Score 1 – Atribuído para os cortes com ausência de imunomarcagem;

Score 2 – Atribuído para os cortes que apresentaram baixo padrão de imunomarcagem;

Score 3 – Atribuído para os cortes que apresentaram moderado padrão de imunomarcagem;

Score 4 – Atribuído para os cortes que apresentaram alto padrão de imunomarcagem.

Score 5 – Atribuído para os cortes que apresentaram áreas de necrose com marcações dos precipitados celulares.

3.12. Análise estatística

Para realizar os testes estatísticos foi utilizado o *software* Pacote Estatístico (Pacotico). A normalidade e a homocedasticidade dos dados foram analisadas e os mesmos foram submetidos ao não paramétrico Kruskal Wallis seguido do teste de Dunn para comparações individuais. Para todos os testes foi adotado o nível de 5% de significância.



4

Resultado

4 Resultados

A análise estatística dos grupos controles foi realizada separadamente dos grupos clareados, com intuito de analisar, isoladamente, o efeito dos fármacos na saúde do tecido pulpar. Na sequência, os resultados foram descritos e apresentados, de acordo com os terços coronários (oclusal, médio e cervical) e radiculares (coronário, médio e apical). Essa divisão foi feita tanto para análise histopatológica quanto para análise de imunohistoquímica.

4.1. Análise histopatológica das porções coronária e radicular dos grupos controles

A análise histopatológica, os 3 grupos controles (G1, G3 e G5) revelaram um aspecto de normalidade do tecido pulpar, com a camada de pré-dentina intacta, vasos sanguíneos normalizados e a camada de odontoblastos mantida, sem a presença de células inflamatórias em quaisquer períodos analisados. O aspecto de normalidade dos tecidos e a resposta biológica semelhante observada nestes grupos mostram que tanto o tratamento com o gel placebo, como os tratamentos medicamentosos testados não lesaram o tecido pulpar (Tabela 1).

Tabela 1 - Medianas de escores atribuídos na análise histológica em cada terço coronário e radicular para todos os grupos controles.

	Terços	G1 Controle			G3 Otosporin®			G5 Tylenol®		
		0h	24h	48h	0h	24h	48h	0h	24h	48h
Coroa	Oclusal	1 Aa	1 Aa	1 Aa	1 Aa	1 Aa	1 Aa	1 Aa	1 Aa	1 Aa
	Médio	1 Aa	1 Aa	1 Aa	1 Aa	1 Aa	1 Aa	1 Aa	1 Aa	1 Aa
	Cervical	1 Aa	1 Aa	1 Aa	1 Aa	1 Aa	1 Aa	1 Aa	1 Aa	1 Aa
Raiz	Coronário	1 Aa	1 Aa	1 Aa	1 Aa	1 Aa	1 Aa	1 Aa	1 Aa	1 Aa
	Médio	1 Aa	1 Aa	1 Aa	1 Aa	1 Aa	1 Aa	1 Aa	1 Aa	1 Aa
	Apical	1 Aa	1 Aa	1 Aa	1 Aa	1 Aa	1 Aa	1 Aa	1 Aa	1 Aa

*Letras maiúsculas iguais significam semelhança entre os tempos de um determinado grupo, e letras minúsculas iguais significam semelhança entre os grupos de um tempo determinado (0h, 24h ou 48h)

4.2. Análise histopatológica da porção coronária dos grupos clareados

A análise estatística dos escores atribuídos na análise histopatológica do tempo imediato, mostra que todos os grupos que receberam tratamento clareador foram



semelhantes entre si ($p>0,05$). Ressalta-se porém que, apenas o grupo G2 apresentou áreas de necrose e ausência celular em toda a extensão da porção coronária (Figura 1) Por outro lado, grupo que recebeu terapia com Tylenol® (G6) apesar do predomínio de áreas de necrose, foram observadas células inflamatórias nos terços coronários (Figura 1), enquanto que no grupo que recebeu aplicação de Otosporin®, verificou-se um infiltrado celular severo, assemelhando-se tanto ao G1 quanto ao G2 (Figura 1).

Já nos tempos de 24 horas e 48 horas, foi observado, nos terços coronários dos grupos G2, G4 e G6, grande proliferação celular e semelhança estatística entre os grupos (Figura 2 e 3). No entanto, pelo fato do G4 apresentar predominantemente infiltrado inflamatório leve, assemelhou-se também ao grupo controle em todos os terços (Figura 2 e 3).

Analisando o desempenho de cada grupo, no decorrer do tempo, constatou-se que os grupos que receberam o tratamento clareador, apresentaram melhora significativa da condição pulpar (Figuras 1, 2 e 3).

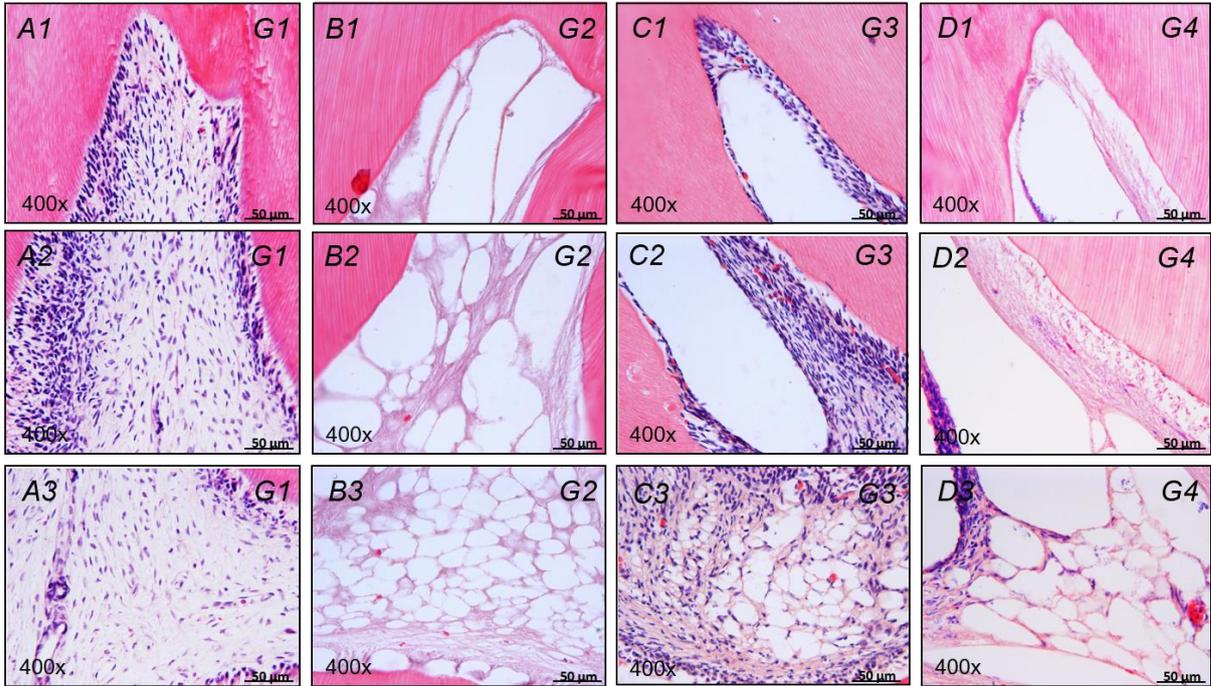
Tabela 2 – Medianas de escores atribuídos na análise histológica de cada terço coronário, para todos os grupos clareados.

	Terços	G1 Controle			G2 Whiteness HP Maxx 35%			G4 Whiteness HP Maxx 35% + Otosporin®			G6 Whiteness HP Maxx 35% + Tylenol®		
		0h	24h	48h	0h	24h	48h	0h	24h	48h	0h	24h	48h
Coroa	Oclusal	1 Ab	1 Ab	1 Ab	5 Aa	4 Ba	4 Ba	4 Aab	3 Bab	3 Bab	5 Aa	4 Ba	4 Ba
	Médio	1 Ab	1 Ab	1 Ab	5 Aa	3 Ba	3 Ba	4 Aab	2 Bab	2 Bab	4 Aa	3 ABA	3 Ba
	Cervical	1 Ab	1 Ab	1 Ab	5 Aa	2 Ba	2 Ba	3 Aab	2 Bab	2 Ba	4 Aa	2 Ba	2 Ba

*Letras maiúsculas iguais significam semelhança entre os tempos de um determinado grupo, e letras minúsculas iguais significam semelhança entre os grupos de um tempo determinado (0h, 24h ou 48h)



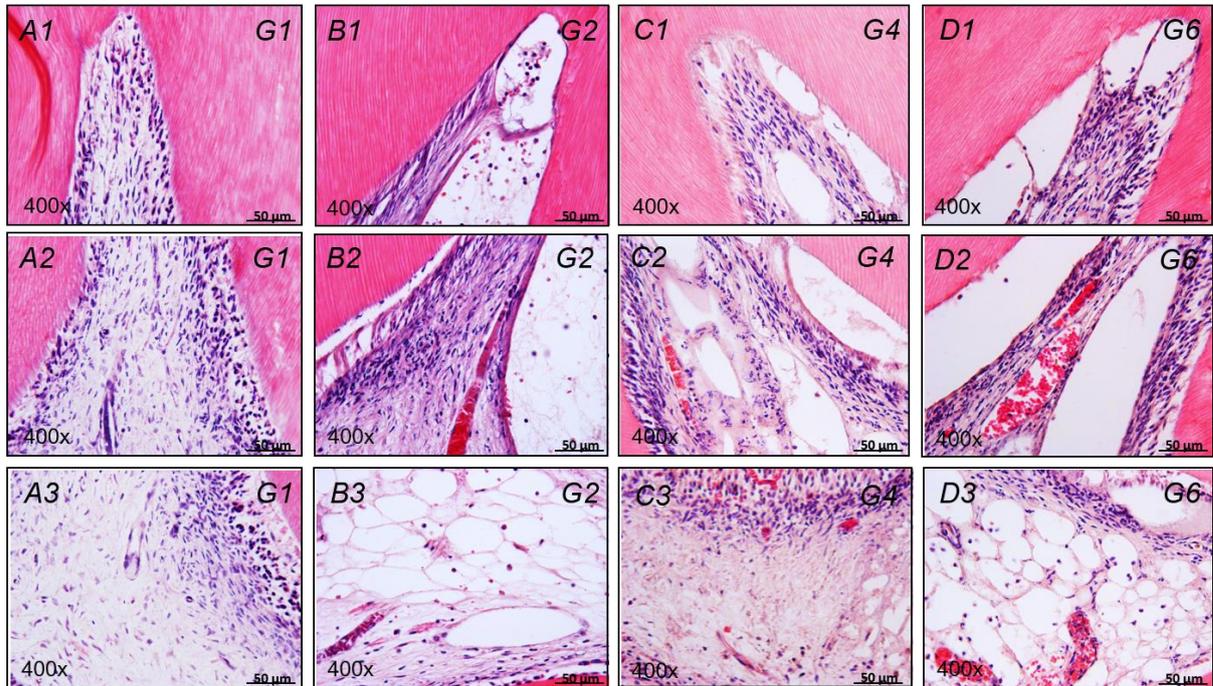
Figura 1 – Corte longitudinal dos terços coronários do tecido pulpar dos grupos de estudo, no tempo imediato. Lâminas coradas por H.E. e observadas em Microscopia Óptica Comum (400x).



As letras A-D representam as terapias de combate à dor: (A) controle; (B) clareamento com PH 35% sem terapia de combate à dor; (C) tratamento clareador associado à aplicação tópica de Otosporin® e (D) terapia clareadora associada à administração por via oral de Tylenol®. Os numeros 1-3 representam os terços coronários: (1) terço oclusal; (2) terço médio e (3) terço cervical.



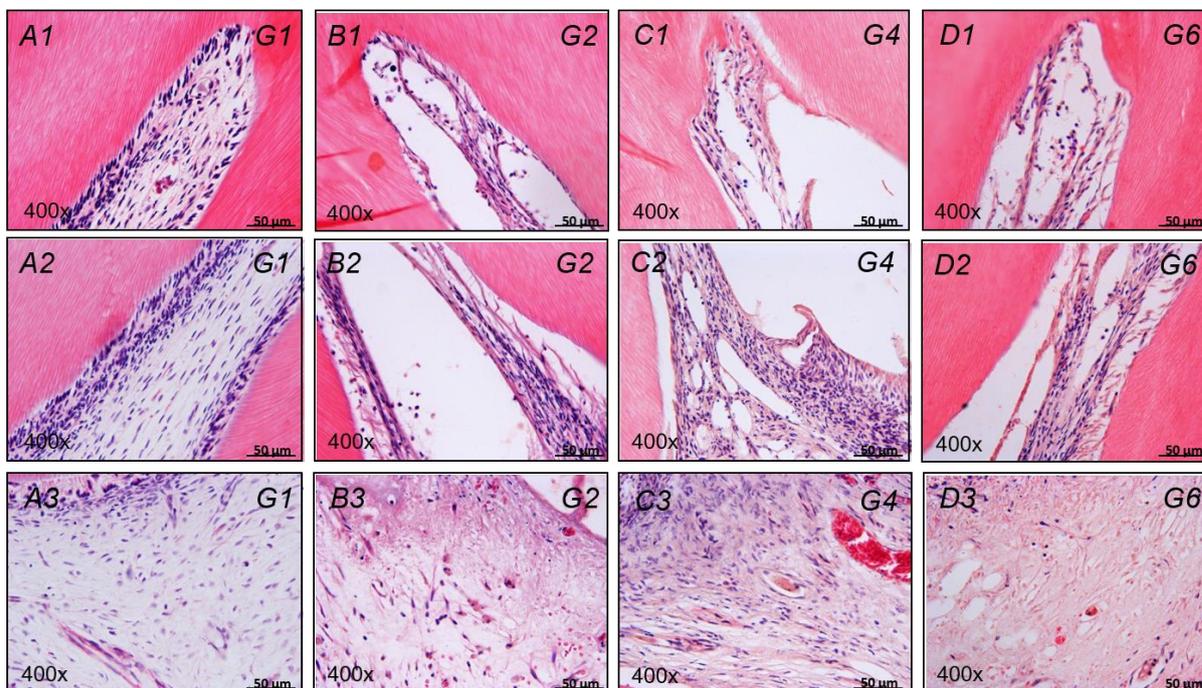
Figura 2 – Corte longitudinal dos terços coronários do tecido pulpar dos grupos de estudo, no tempo 24 horas após clareamento. Lâminas coradas por H.E. e observadas em Microscopia Óptica Comum (400x).



As letras A-D representam as terapias de combate à dor: (A) controle; (B) clareamento com PH 35% sem terapia de combate à dor; (C) tratamento clareador associado à aplicação tópica de Otosporin® e (D) terapia clareadora associada à administração por via oral de Tylenol®. Os números 1-3 representam os terços coronários: (1) terço oclusal; (2) terço médio e (3) terço cervical.



Figura 3 – Corte longitudinal dos terços coronários do tecido pulpar dos grupos de estudo, no tempo 48 horas após clareamento. Lâminas coradas por H.E. e observadas em Microscopia Óptica Comum (400x).



As letras A-D representam as terapias de combate à dor: (A) controle; (B) clareamento com PH 35% sem terapia de combate à dor; (C) tratamento clareador associado à aplicação tópica de Otosporin® e (D) terapia clareadora associada à administração por via oral de Tylenol®. Os números 1-3 representam os terços coronários: (1) terço oclusal; (2) terço médio e (3) terço cervical.

4.3. Análise histológica da porção radicular dos grupos clareados

Em relação à análise da porção radicular, no tempo imediato, todos os grupos clareados foram semelhantes. Apesar disso, somente o grupo G2 apresentou um infiltrado celular severo no terço coronário (Figura 4: B1). , enquanto que G6 apresentou infiltrado inflamatório moderado (Figura 4: D1) e o G4 um infiltrado leve (Figura 4: C1), este assemelhando-se também ao grupo controle (G1) (Figura 4: A1).

Nas análises dos tempos 24 e 48 horas, não foi detectada diferença estatística entre os grupos nos terços estudados (Tabela 3 e Figura 4: A2-D2, A3-D3).

Vale destacar, no entanto, que foram detectados em G2 e G6, mostrou melhora do quadro inflamatório do terço coronário e médio com o decorrer do tempo, sendo o tempo imediato diferente estatisticamente dos demais. Já o G4 houve diferença apenas no terço coronário, sendo o imediato diferente dos demais, e a partir do terço médio os tempos se igualaram, apresentando ausência de processo inflamatório



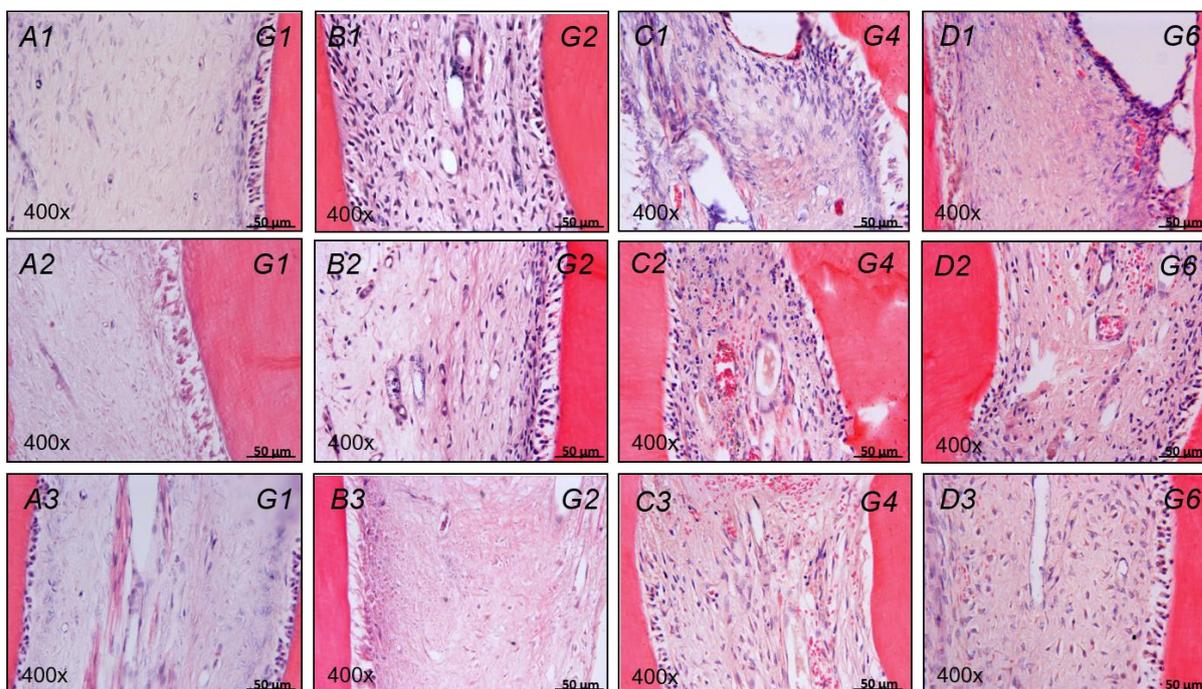
(Figura 4: C1-C3). Analisando o terço apical observou-se que esta região se manteve inalterada ao longo dos tempos analisados em todos os grupos.

Tabela 3 – Medianas de escores atribuídos na análise histológica em cada terço radicular para todos os grupos estudados.

Raiz	Terços	Controle			Whiteness HP Maxx 35%			Whiteness HP Maxx 35% + Otosporin®			Whiteness HP Maxx 35% + Tylenol®		
		0h	24h	48h	0h	24h	48h	0h	24h	48h	0h	24h	48h
Raiz	Coronário	1 Ab	1 Aa	1 Aa	4 Aa	1 Ba	1 Ba	2 Aab	1 Ba	1 Ba	3 Aa	1 Ba	1 Ba
	Médio	1 Ab	1 Aa	1 Aa	2 Aa	1 Ba	1 Ba	1 Ab	1 Aa	1 Aa	2 Aa	1 Ba	1 Ba
	Apical	1 Aa	1 Aa	1 Aa	1 Aa	1 Aa	1 Aa	1 Aa	1 Aa	1 Aa	1 Aa	1 Aa	1 Aa

*Letras maiúsculas iguais significam semelhança entre os tempos de um determinado grupo, e letras minúsculas iguais significam semelhança entre os grupos de um tempo determinado (0h, 24h ou 48h)

Figura 4 – Corte longitudinal do terço coronário da porção radicular do tecido pulpar dos grupos de estudo, nos diferentes tempos de análise. Lâminas coradas por H.E. e observadas em Microscopia Óptica Comum (400x).



As letras A-D representam as terapias de combate à dor: (A) controle; (B) clareamento com PH 35% sem terapia de combate à dor; (C) tratamento clareador associado à aplicação tópica de Otosporin® e (D) terapia clareadora associada à administração por via oral de Tylenol®. Os numeros 1-3 representam os terços coronários: (1) tempo imediato; (2) 24 horas e (3) 48 horas após clareamento.

4.4. Análise imunoistoquímica dos grupos controles



Analisando a imunomarcção observa-se que os 3 grupos controles (G1, G3 e G5), apresentaram imunomarcção leve para ambos os neuropeptídeos (SP e CGRP), em todos os terços e todos os tempos analisados, não apresentando diferença estatística (Tabela 4 e Tabela 5).

Tabela 4 – Medianas de escores atribuídos à imunomarcção da SP em cada terço coronário e radicular para todos os grupos controles.

	Terços	Controle			G3 Otosporin®			G5 Tylenol®		
		0h	24h	48h	0h	24h	48h	0h	24h	48h
Coroa	Oclusal	2 Aa	2 Aa	2 Aa	2 Aa	2 Aa	2 Aa	2 Aa	2 Aa	2 Aa
	Médio	2 Aa	2 Aa	2 Aa	2 Aa	2 Aa	2 Aa	2 Aa	2 Aa	2 Aa
	Cervical	2 Aa	2 Aa	2 Aa	2 Aa	2 Aa	2 Aa	2 Aa	2 Aa	2 Aa
Raiz	Coronário	2 Aa	2 Aa	2 Aa	2 Aa	2 Aa	2 Aa	2 Aa	2 Aa	2 Aa
	Médio	2 Aa	2 Aa	2 Aa	2 Aa	2 Aa	2 Aa	2 Aa	2 Aa	2 Aa
	Apical	2 Aa	2 Aa	2 Aa	2 Aa	2 Aa	2 Aa	2 Aa	2 Aa	2 Aa

*Letras maiúsculas iguais significam semelhança entre os tempos de um determinado grupo, e letras minúsculas iguais significam semelhança entre os grupos de um tempo determinado (0h, 24h ou 48h)

Tabela 5 – Medianas de escores atribuídos à imunomarcção da CGRP em cada terço coronário e radicular para todos os grupos controles.

	Terços	G1 Controle			G3 Otosporin®			G4 Tylenol®		
		0h	24h	48h	0h	24h	48h	0h	24h	48h
Coroa	Oclusal	2 Aa	2 Aa	2 Aa	2 Aa	2 Aa	2 Aa	2 Aa	2 Aa	2 Aa
	Médio	2 Aa	2 Aa	2 Aa	2 Aa	2 Aa	2 Aa	2 Aa	2 Aa	2 Aa
	Cervical	2 Aa	2 Aa	2 Aa	2 Aa	2 Aa	2 Aa	2 Aa	2 Aa	2 Aa
Raiz	Coronário	2 Aa	2 Aa	2 Aa	2 Aa	2 Aa	2 Aa	2 Aa	2 Aa	2 Aa
	Médio	2 Aa	2 Aa	2 Aa	2 Aa	2 Aa	2 Aa	2 Aa	2 Aa	2 Aa
	Apical	2 Aa	2 Aa	2 Aa	2 Aa	2 Aa	2 Aa	2 Aa	2 Aa	2 Aa

*Letras maiúsculas iguais significam semelhança entre os tempos de um determinado grupo, e letras minúsculas iguais significam semelhança entre os grupos de um tempo determinado (0h, 24h ou 48h)

4.5. Análise imunoistoquímica do marcador SP nos terços coronários dos grupos experimentais

A tabela 6 mostra que, no tempo imediato, os terços coronários do G2 apresentaram áreas de necrose em todos os cortes analisados. Este fato resultou em



diferenciação estatística com o grupo controle (G1), que apresentou marcação leve, porém sem a presença de áreas necróticas.

Quando analisados os grupos que receberam tratamento medicamentoso, apesar de G4 caracterizar-se no tempo imediato pelo alto padrão de imunomarcção e, G6, pela predominância de áreas de necrose, ambos foram semelhantes ao grupo controle em toda a porção coronária. No terço cervical, o G4 apresentou comportamento superior ao G2, assemelhando-se ao G1 (Figura 5: A-D).

Ainda na tabela 6, a análise do tempo de 24 horas mostra que no terço oclusal, todos os grupos clareados foram semelhantes entre si. Já no terço médio, o G2 foi semelhante apenas com o G6, enquanto que no terço cervical todos os grupos clareadores se assemelharam novamente e tanto G4, quanto G6 foram semelhantes ao G1 (Figura 5: E-H).

No tempo de 48 horas, observou-se que o G2 diferenciou-se dos demais nos terços oclusal e médio, apresentando imunomarcção moderada e leve respectivamente. Todos os grupos se igualaram no terço cervical, apresentando baixo padrão de imunomarcção (Figura 5: I-L).

Na análise da SP, observou-se também que, de uma forma geral, com o decorrer do tempo todos os grupos tiveram uma melhora gradual e contínua em todos os terços (Figura 5).

Tabela 6 – Medianas de escores atribuídos à imunomarcção da SP em cada terço coronário para todos os grupos estudados.

Coroa	Terços	G1 Controle			G2 Whiteness HP Maxx 35%			G4 Whiteness HP Maxx 35% + Otosporin®			G6 Whiteness HP Maxx 35% + Tylenol®		
		0h	24h	48h	0h	24h	48h	0h	24h	48h	0h	24h	48h
	Oclusal	2 Ab	2 Ab	2 Ab	5 Aa	4 ABa	3 Ba	4 Aab	3 ABab	2 Bb	5 Aab	3 ABab	2 Bb
	Médio	2 Ab	2 Ab	2 Ab	5 Aa	4 ABa	2 Ba	4 Aab	2 Bb	2 Bb	4 Aab	3 ABab	2 Bb
	Cervical	2 Ab	2 Ab	2 Ab	5 Aa	3 ABa	2 b	3 Ab	2 Bab	2 Bb	4 Aab	2 Bab	2 Bb

*Letras maiúsculas iguais significam semelhança entre os tempos de um determinado grupo, e letras minúsculas iguais significam semelhança entre os grupos de um tempo determinado (0h, 24h ou 48h)

4.6. Análise imunoistoquímica do marcador SP nos terços radiculares dos grupos experimentais



Analisando o tempo imediato, observa-se que o G2 apresentou alto padrão de imunomarcção nos terços coronário e médio da raiz, diferenciando-se do grupo G4 e G6, que mostrou marcação moderada e leve respectivamente (Figura 5: A-D).

No tempo de 24 horas, observou-se no terço coronário que o grupo G2 apresentou um padrão moderado de marcação, enquanto que os demais grupos apresentaram um padrão leve, diferindo-se estatisticamente apenas de G1 e G4. Nos demais terços, todos os grupos assemelharam-se entre si.

Em relação ao tempo de 48 horas, foi comprovada semelhança entre todos os grupos, em todos os terços analisados.

Quando analisados o comportamento de cada grupo no decorrer do tempo, o grupo G2 mostrou uma diminuição na marcação nos terços coronário e médio da raiz, enquanto que os grupos G1, G4 e G4, mantiveram suas características em todos os tempos analisados. O terço apical se manteve inalterado durante entre todos os tempos.

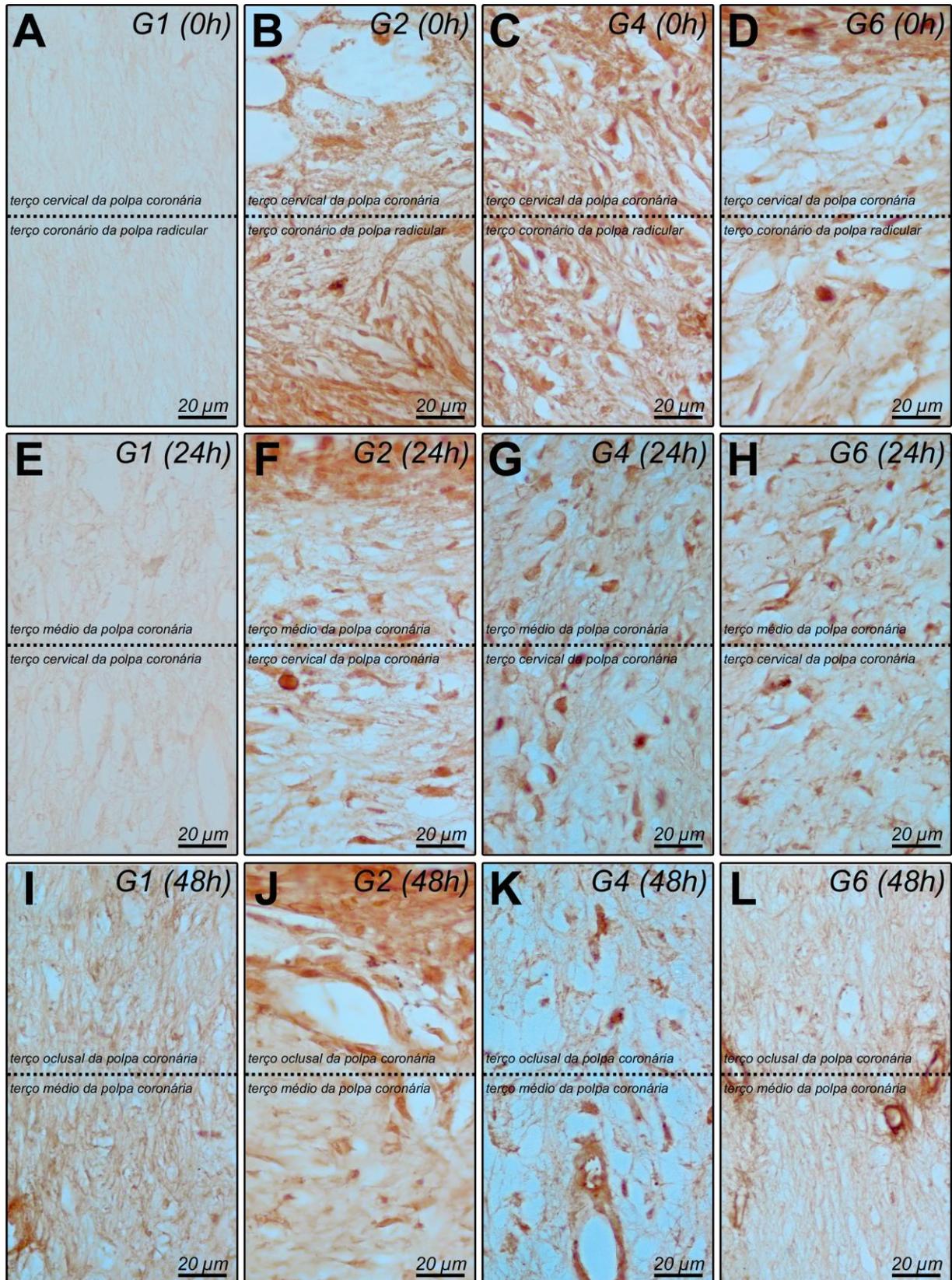
Tabela 7 – Medianas de escores atribuídos à imunomarcção da SP em cada terço radicular para todos os grupos estudados.

Raiz	Terços	G1 Controle			G2 Whiteness HP Maxx 35%			G4 Whiteness HP Maxx 35% + Otosporin®			G6 Whiteness HP Maxx 35% + Tylenol®		
		0h	24h	48h	0h	24h	48h	0h	24h	48h	0h	24h	48h
	Coronário	2 Ab	2 Ab	2 Aa	4 Aa	3 ABa	3 Ba	3 Ab	2 Ab	2 Aa	2 Ab	2 Aab	2 Aa
	Médio	2 Ab	2 Aa	2 Aa	4 Aa	2 Ba	2 Ba	2 Ab	2 Aa	2 Aa	2 Ab	2 Aa	2 Aa
	Apical	2 Aa	2 Aa	2 Aa	2 Aa	2 Aa	2 Aa	2 Aa	2 Aa	2 Aa	2 Aa	2 Aa	2 Aa

*Letras maiúsculas iguais significam semelhança entre os tempos de um determinado grupo, e letras minúsculas iguais significam semelhança entre os grupos de um tempo determinado (0h, 24h ou 48h)



Figura 5 – Cortes histológicos apresentando o padrão de imunomarcação para SP.



As letras A-D correspondem às fotomicrografias do terço cervical da polpa coronária e do terço coronário da polpa radicular nos grupos controle (A), clareamento com PH 35% sem terapia de combate à dor (B), terapia clareadora associada à administração por via oral de Tylenol® (C) e tratamento clareador associado à aplicação tópica de Otosporin® (D) imediatamente após o tratamento clareador. As letras E-H correspondem às



fotomicrografias do terço médio e cervical da polpa coronária nos grupos controle (E), clareamento com PH 35% combate à dor (F), terapia clareadora associada à administração por via oral de Tylenol® (G) e tratamento clareador associado à aplicação tópica de Otosporin® (H) 24 horas após a terapia clareadora. As letras I-L correspondem às fotomicrografias do terço oclusal e médio da polpa coronária nos grupos controle (I), clareamento com PH 35% sem terapia de combate à dor (J), terapia clareadora associada à administração por via oral de Tylenol® (K) e tratamento clareador associado à aplicação tópica de Otosporin® (L) 48 horas após a terapia clareadora. Aumento original: 1000x.

4.7. Análise imunoistoquímica do marcador CGRP dos terços coronários dos grupos experimentais

Analisando a expressão do neuropeptídeo CGRP, observou-se que no tempo imediato, o G2 apresentou necrose em todos os terços analisados, impossibilitando a visualização da marcação. Este fato acarretou em diferenciação estatística com grupo controle (G1) e com G4 no terço cervical, que apresentaram marcação leve. Neste período de análise, observou-se ainda que o G4 e G6 apresentaram alto padrão de imunomarcação, sendo semelhantes ao que não foi submetido ao tratamento clareador em toda a porção coronária (Figura 6: A-D).

No tempo de 24 horas, analisando os terços médio e oclusal, todos os grupos clareados (G2, G4 e G6) foram semelhantes entre si, destacando que o G4 e G6 se assemelharam ao G1, que não recebeu tratamento clareador ou medicamento. Analisando o terço cervical, observou-se que o tratamento com Otosporin® (G4), favoreceu a resposta tecidual, quando comparado com G2 (Figura 6: E-H).

No tempo de 48 horas, observa-se no terço oclusal que o G2 apresentou imunomarcação moderada, diferenciando-se dos demais grupos, que apresentaram imunomarcação leve. Todos os grupos se igualaram a partir do terço médio, apresentando baixo padrão de imunomarcação (Figura 6: I-L).

Na análise do comportamento da expressão de CGRP decorrer do tempo, observou-se que, de uma forma geral, todos os grupos tiveram uma melhora gradual e contínua em todos os terços.



Tabela 8 – Medianas de escores atribuídos à imunomarcagem da CGRP em cada terço coronário para todos os grupos estudados.

Coroa	Terços	G1 Controle			G2 Whiteness HP Maxx 35%			G4 Whiteness HP Maxx 35% + Otosporin®			G6 Whiteness HP Maxx 35% + Tylenol®		
		0h	24h	48h	0h	24h	48h	0h	24h	48h	0h	24h	48h
	Oclusal	2 Ab	2 Ab	2 Ab	5 Aa	4 ABa	3 Ba	4 Aab	3 ABab	2 Bb	4 Aab	3 ABab	2 Bb
	Médio	2 Ab	2 Ab	2 Aa	5 Aa	4 ABa	2 Ba	4 Aab	3 ABab	2 Ba	4 Aab	3 ABab	2 Ba
	Cervical	2 Ac	2 Ab	2 Aa	5 Aa	4 ABa	2 Ba	3 Abc	2 Bb	2 Ba	4 Aab	2 ABab	2 Ba

*Letras maiúsculas iguais significam semelhança entre os tempos de um determinado grupo, e letras minúsculas iguais significam semelhança entre os grupos de um tempo determinado (0h, 24h ou 48h)

4.8. Análise imuno--histoquímica do marcador CGRP dos terços radiculares dos grupos experimentais

Analisando o tempo imediato, observa-se que o G2 apresentou alto padrão de imunomarcagem nos terços coronário e médio da raiz, diferenciando-se apenas do grupo G4 no terço oclusal e médio e do G6 no terço médio. Já no terço apical todos os grupos foram semelhantes (Figura 6: A-D).

No tempo de 24 horas, observou-se no terço coronário que o grupo G2 apresentou um padrão moderado de marcação, enquanto que os demais grupos apresentaram um padrão leve, diferenciando-se apenas do G4 e do G1. Nos demais terços, todos os grupos se assemelharam. Em relação ao tempo de 48 horas, foi encontrada semelhança entre todos os grupos em todos os terços analisados.

Analisando o comportamento ao longo dos tempos analisados, o grupo G2 mostrou uma diminuição na marcação nos terços coronário e médio da raiz, enquanto que os grupos G1, G3 e G4, se igualaram em todos os tempos analisados, nos mesmos terços citados. O terço apical, se igualou entre todos os grupos em todos os tempos analisados.



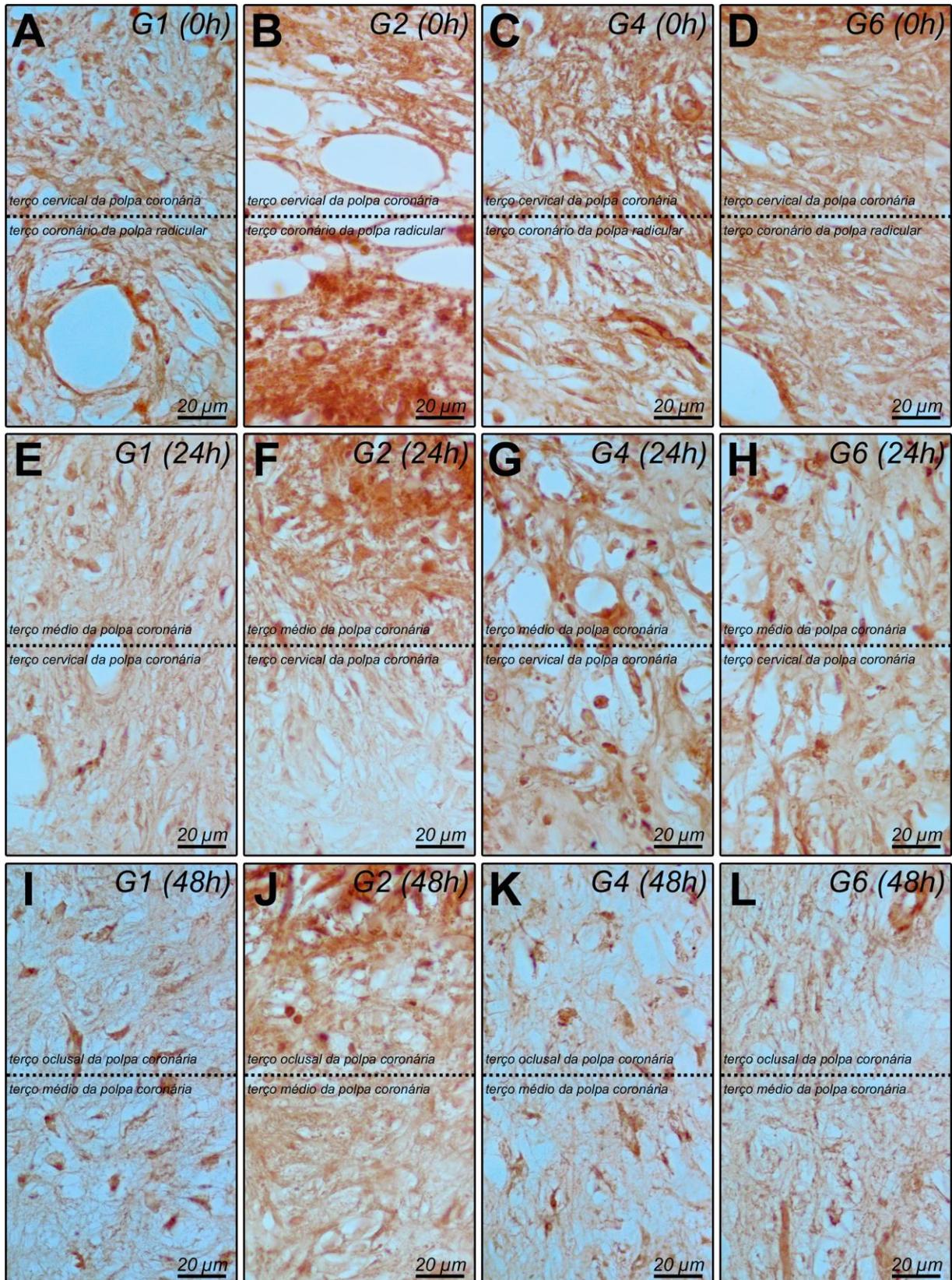
Tabela 9 – Medianas de escores atribuídos à imunomarcção da CGRP em cada terço radicular para todos os grupos estudados.

	Terços	G1 Controle			G2 Whiteness HP Maxx 35%			G4 Whiteness HP Maxx 35% + Otosporin®			G6 Whiteness HP Maxx 35% + Tylenol®		
		0h	24h	48h	0h	24h	48h	0h	24h	48h	0h	24h	48h
Raiz	Coronário	2 Ab	2 Ab	2 Aa	4 Aa	3 ABa	3 Ba	3 Ab	2 Ab	2 Aa	3 Aab	2 Aab	2 Aa
	Médio	2 Ab	2 Aa	2 Aa	4 Aa	2 Ba	2 Ba	2 Ab	2 Aa	2 Aa	2 Ab	2 Aa	2 Aa
	Apical	2 Aa	2 Aa	2 Aa	2 Aa	2 Aa	2 Aa	2 Aa	2 Aa	2 Aa	2 Aa	2 Aa	2 Aa

*Letras maiúsculas iguais significam semelhança entre os tempos de um determinado grupo, e letras minúsculas iguais significam semelhança entre os grupo de um tempo determinado (0h, 24h ou 48h)



Figura 6 – Cortes histológicos apresentando o padrão de imunomarcção para CGRP



As letras A-D correspondem às fotomicrografias do terço cervical da polpa coronária e do terço coronário da polpa radicular nos grupos controle (A), clareamento com PH 35% sem terapia de combate à dor (B), terapia clareadora associada à administração por via oral de Tylenol® (C) e tratamento clareador associado à aplicação tópica de Otosporin® (D) imediatamente após o tratamento clareador. As letras E-H correspondem às fotomicrografias do terço médio e cervical da polpa coronária nos grupos controle (E), clareamento com PH 35% sem terapia de



combate à dor (F), terapia clareadora associada à administração por via oral de Tylenol® (G) e tratamento clareador associado à aplicação tópica de Otosporin® (H) 24 horas após a terapia clareadora. As letras I-L correspondem às fotomicrografias do terço oclusal e médio da polpa coronária nos grupos controle (I), clareamento com PH 35% sem terapia de combate à dor (J), terapia clareadora associada à administração por via oral de Tylenol® (K) e tratamento clareador associado à aplicação tópica de Otosporin® (L) 48 horas após a terapia clareadora. Aumento original: 1000x.



5

*D*issertação

5 Discussão

O clareamento dentário pode ser considerado uma técnica segura, desde que realizado mediante uma posologia adequada. Porém, quando indicado erroneamente e realizado sem a devida acurácia técnica, pode causar sérios danos à polpa dentária. Existem diversas pesquisas comprovando a penetração trans-amelodentinária do H₂O₂ atingindo a câmara pulpar (DE ALMEIDA et al., 2015a, 2015b; BRISO et al., 2015a, 2015b; MARSON et al., 2015; CINTRA et al., 2016b; GONÇALVES et al., 2016), bem como a citotoxicidade deste produto (SOARES et al., 2014a; DE ALMEIDA et al., 2015a, 2015b; GONÇALVES et al., 2016).

Apesar do grande número de publicações comprovando os potenciais efeitos tóxicos que peróxido oriundo dos géis clareadores pode ocasionar ao tecido pulpar, a grande maioria das pesquisas são realizadas in vitro, existindo poucos estudos sobre os efeitos do clareamento no tecido pulpar (COSTA et al., 2010; CINTRA et al., 2012, 2013, 2016a, 2016b).

Neste contexto, este estudo utilizou como modelo experimental ratos Wistar, que por serem facilmente adquiridos e apresentarem facilidade de manuseio (CINTRA et al., 2016a), possibilita o avanço no conhecimento que envolve as terapias anti-álgicas, possivelmente utilizadas em associação com as técnicas clareadoras.

No presente estudo, a análise histopatológica da polpa dos ratos submetidos ao tratamento clareador mostrou grandes áreas de necrose no tecido pulpar de ratos, imediatamente após o procedimento clareador realizado com peróxido de hidrogênio 35%. Possivelmente, as características histológicas da estrutura dentária dos ratos, bem como a sua espessura e o grau de dureza da estrutura dentária (NELSON-FILHO et al., 2012) inferiores ao dos humanos, favoreceram a penetração intensa do peróxido de hidrogênio, gerando a dissolução imediata do tecido pulpar, antes mesmo que a enzima catalase e os processos de reparação tecidual fossem significativos (BOWLES; BURNS, 1992). Nas análises subsequentes, realizadas 24 horas e 48 horas após o procedimento clareador, foi observada na porção coronária, uma melhora gradual e contínua no quadro inflamatório dos tecidos. Este fato provavelmente relaciona-se com o recrutamento de células mesenquimais



indiferenciadas da polpa radicular, onde a integridade tecidual foi mantida, resultando em um tecido mais celularizado.

O estudo de Cintra et al. (2013) mostrou grande ocorrência de morte celular no grupo submetido a apenas 1 sessão de clareamento com peróxido de hidrogênio 35% por 45 minutos, sendo observadas áreas de intenso infiltrado inflamatório, com presença de hemorragia, vasos dilatados e congestionados e também a desorganização da camada odontoblástica, corroborando assim com os resultados do presente estudo, quando a análise foi realizada no período de 48 horas (CINTRA et al., 2013). Destaca-se porém, que o referido estudo analisou somente o período de 48 horas, restando dúvidas sobre a resposta obtida nas primeiras horas após a sessão clareadora, período que coincide com os momentos de maior ocorrência de sensibilidade dentária. Neste contexto o presente estudo pode contribuir para o conhecimento da resposta pulpar nos períodos mais curtos, mostrando o intenso potencial agressor da técnica clareadora.

Com intuito de amenizar o desconforto comumente relatado durante o tratamento clareador, alguns profissionais tem preconizado empiricamente o uso tópico de corticosteroides. Este fármaco vem sendo utilizado no tratamento da hipersensibilidade, bem como Endodontia desde a década de 60, apresentando resultados clínicos e histológicos promissores (FRY et al., 1960; DACHI; STIGERS, 1964).

No presente estudo utilizou-se o Otosporin® sobre o esmalte dentário, imediatamente após a terapia clareadora, objetivando reduzir a reação inflamatória causada pelo tratamento. A análise histológica revelou que o uso deste medicamento pode trazer vantagens uma vez que o tecido pulpar dos animais que receberam o corticosteroide manteve-se mais celularizado, com pequenas áreas de necrose, enquanto que o grupo que recebeu apenas o tratamento clareador, apresentou necrose total da polpa coronária.

No estudo de Holland et al. (1991), foi observado que o Otosporin®, mesmo fármaco utilizado no presente estudo, obteve maior poder de penetração pela estrutura dentinária quando comparada com outros fármacos, após 5 minutos de contato com o dente. Além do alto poder de penetração pela estrutura dentinária, vale destacar que os corticosteréides reduzem o infiltrado inflamatório e produtos oriundos das células inflamatórias, bem como a diminuição da produção de prostaglandinas, principal mediador do processo inflamatório. Além destes efeitos o Otosporin®



também tem a capacidade de atuar na vasoconstrição da área inflamada, diminuindo o edema e desconforto, estabilizando as membranas das células nervosas (LUYK et al., 1985).

Outra manobra de combate à dor durante o tratamento clareador, baseia-se na prescrição de fármacos que diminuem a sensação dolorosa causada pela terapia clareadora. Neste estudo, foi selecionado o Tylenol®, por ser um anti-inflamatório com menos efeitos colaterais e de eficácia analgésica comprovada (GRAHAM et al., 2013). Este fármaco atua diretamente na cascata do ácido araquidônico, impedindo a produção de prostaglandinas, um dos principais mediadores inflamatórios (SWIERKOSZ et al., 2002; GRAHAM et al., 2013).

Neste contexto, mesmo não sendo revelado pela análise estatística, observou-se claramente que os animais que receberam o Tylenol® apresentaram um padrão histológico distinto do grupo que não recebeu nenhum tratamento anti-álgico, como pode ser observado na Figura 1. A análise histológica evidenciou, em alguns espécimes, a presença de um infiltrado inflamatório severo, com presença de células inflamatórias, algumas mononucleares, e com algumas áreas de necrose. Já no grupo que recebeu somente o tratamento clareador, no tempo imediato, observa-se em todos os espécimes, somente áreas de necrose na porção coronária, sem a presença de células. Com isso, acredita-se que a administração deste fármaco pode trazer benefícios no processo inflamatório, merecendo estudos ajustando dosagens dos produtos clareadores, bem como do fármaco. O uso de ambos os fármacos e o efeito após a terapia clareadora faz com que a primeira hipótese nula deste estudo seja parcialmente aceita.

Quanto à presença e as mudanças nos níveis dos neuropeptídeos (CGRP e SP) no tecido pulpar, ressaltamos que estas substâncias são produzidas predominantemente por neurônios sensoriais primários, especialmente aqueles envolvidos com a transmissão da informação nociceptiva. Estes neuropeptídeos, quando liberados centralmente funcionam como neuromediadores (OTSUKA; YOSHIOKA, 1993), ao passo que quando liberado periféricamente, no receptor sensorial, contribuem para a homeostase tecidual e em condições patológicas são agentes que desencadeiam a inflamação neurogênica (FERREIRA, 1995). Estas substâncias são produzidas ao nível do corpo celular e são transportadas em vesículas tanto para o prolongamento que se direciona ao sistema nervoso central,



quanto para o prolongamento que direciona ao receptor sensorial (MERIGHI et al., 1988; PLENDERLEITH et al., 1990; HARRISON; GEPETTI, 2001).

No receptor sensorial, tais neuropeptídios apresentam um nível de liberação basal (FERREIRA, 1995), que é constante o que justifica a presença da imunomarcacão leve para no grupo controle. Todavia, em condições patológicas, são liberados em maior quantidade tanto ao nível central, quanto periférico, o que desencadeia respectivamente, dor e inflamação neurogênica, tendo em vista que a potência destes peptídeos chega a ser mil ou mais vezes superior a de outros neuromediadores. Por esta razão, o estudo da presença destes neuropeptídios no tecido pulpar pode oferecer dados objetivos dos efeitos de clareadores e fármacos na sensibilidade dentária.

Neste estudo, devido às grandes áreas de necrose observadas no tempo imediato, foi possível a observação da imunomarcacão dos neuropeptídios estudados apenas nos precipitados celulares. Principalmente no grupo 2, que apresentou necrose em todos os espécimes, ao longo da polpa coronária. Nos demais grupos observou-se imunomarcacão positiva para os neuropeptídios estudados. Essa imunomarcacão positiva, indica uma sensaçã dolorosa exacerbada quando comparado com as polpas dentárias sadias.

Com a regeneraçã tecidual observada no período de 24 horas após o clareamento, pôde-se observar imunomarcacão positiva, tanto para CGRP quanto para SP, em todos os grupos que receberam tratamento clareador. Porém, as polpas de dentes que receberam o tratamento clareador apresentaram maior expressã dos neuropeptídios, quando comparado ao grupo que não recebeu a terapia clareadora. Este resultado está de acordo com um estudo realizado por Caviedes-Bucheli et al. (2006), que observaram que tanto CGRP quanto SP apareceram em todas as polpas, porém em níveis aumentados em polpas inflamadas (CAVIEDES-BUCHELI et al., 2006). No referido estudo, os autores indicam que os níveis aumentados destes neuropeptídios (SP e CGRP) sugerem que a regulaçã neuronal do fluxo sanguíneo pulpar é controlada por fibras nervosas aferentes primárias (sensorial) e fibras simpáticas (CAVIEDES-BUCHELI et al., 2006), fibras que estão localizados os neuropeptídios.

Ainda neste contexto, Awawdeh et al. (2002) analisou a expressã de SP e CGRP, além da Neuroquinina A em polpas de dente humano saudáveis e com sensaçã dolorosa, e observaram que nas polpas com sintomatologia dolorosa os



níveis dos neuropeptídios estavam aumentados em relação ao tecido pulpar saudável, também corroborando com os resultados obtidos neste estudo. No referido estudo os autores sugerem que os níveis aumentados dos neuropeptídios é devido ao fato de que as fibras nervosas aferentes peptidérgicas na polpa dentária além de conduzir impulsos ao sistema nervoso central, também desempenham um papel ativo e importante na resposta global da lesão celular. Esse aumento da expressão de neuropeptídios em polpas inflamadas justifica a quantidade de queixa de sensibilidade dentária relatada pelos pacientes após os procedimentos clareadores (ALMEIDA et al., 2012; RAHAL et al., 2015; MACHADO et al., 2016).

Diante dos resultados do presente estudo, pode-se considerar que o uso do Tylenol® e, principalmente, do Otosporin®, tiveram efeitos positivos na expressão de neuropeptídeos relacionados à dor, minimizando os efeitos algícos deste tratamento, rejeitando assim a segunda hipótese deste estudo.

O Otosporin® tem a capacidade de suprimir alterações vasculares inflamatórias podendo prevenir a pressão induzida pelo colapso venoso, estimulando menos as fibras nervosas e conseqüentemente diminuindo a produção de neuropeptídeos relacionados à dor (SP e CGRP). Souza, et al (1996), analisaram o efeito na polpa dentária que o medicamento Otosporin® promove, quando aplicado em cavidades realizadas em dentes de cães. Os autores observaram que as associações de corticosteróide-antibiótico proporciona uma reação inflamatória ligeiramente menor do que a observada no grupo que não recebeu a medição. O estudo de Souza (1996) pode justificar parcialmente o resultado obtido no presente estudo, uma vez que a redução do processo inflamatório, foi acompanhada de redução da marcação de neuropeptídios.

Já o fármaco Tylenol® atua na inibição da COX-3 que é responsável pela produção de prostaglandina, portanto, o fármaco diminui a produção deste mediador, atuando diretamente na inflamação, com a redução do quadro inflamatório (GRAHAM et al., 2013). O uso deste fármaco foi mais significativo na análise da expressão dos neuropeptídios, devido ao seu efeito analgésico predominante. Soma-se a isso a ação indireta deste fármaco na produção e liberação destes neuropeptídios, devido a diminuição do quadro inflamatório.

Quando os tempos de cada grupo foram comparados, observou-se uma diminuição da expressão dos principais neuropeptídios relacionados à dor. Isso pode ser justificado pela regeneração tecidual observada nos resultados histológicos. Com



a regeneração, o processo inflamatório diminuiu, o que levou a diminuição do estímulo das fibras nervosas, diminuindo a produção e liberação deste neuropeptídeos. Sendo assim, a terceira hipótese nula deste estudo foi rejeitada.

Destacamos ainda que a análise realizada entre os grupos controles possibilitou constatar que os fármacos utilizados não produziram nenhum efeito adverso no tecido saudável, mantendo o aspecto de normalidade, semelhante ao observado no grupo controle. Este fato indica que tais fármacos não produziram nenhuma influência negativa nas amostras analisadas, e que os efeitos negativos foram causados apenas pelo gel clareador.

Apesar das limitações do modelo experimental como a alta concentração do produto utilizado nos dentes dos ratos, além das características morfológicas (espessura e dureza) ser inferiores às características do dente humano e também da resposta biológica exacerbada em comparação com o dente humano, os resultados colhidos mostram que este tratamento pode ser altamente danoso ao tecido pulpar. Mesmo considerando os possíveis efeitos promissores dos fármacos testados, o tratamento clareador deve manter-se sob cuidados de profissionais habilitados para administrar a terapia clareadora indicada para cada dente a ser clareado.



6

Conclusão

6 Conclusão

Levando em consideração os dados obtidos e as limitações do modelo experimental, podemos concluir que:

- O uso de peróxido em alta concentração provocou danos severos no tecido pulpar de ratos, os quais atingiram até o terço médio da raiz;
- A aplicação tópica do Otosporin® mostrou ser uma alternativa eficaz para minimizar os efeitos colaterais do tratamento clareador em tecido pulpar de ratos, levando a diminuição do processo inflamatório;
- Os tratamentos com fármacos reduziram a imunomarcagem dos principais neuromediadores relacionados com dor;
- O quadro inflamatório bem como a imunomarcagem dos principais neuropeptídeos relacionados à dor diminuíram com o decorrer do tempo.



7

Referências

7 Referências bibliográficas

ALMEIDA, L. C.; RIHEL, H.; SANTOS, P. H.; SUNDFELD, M. L.; BRISO, A. L.F. Clinical evaluation of the effectiveness of different bleaching therapies in vital teeth. **Int J Periodontics Restorative Dent.**, Chicago, v.32, n. 3, p. 303-309, jun. 2012.

ANDERSON, B. J. Paracetamol (Acetaminophen): mechanisms of action. **Paediatr Anaesth.**, Paris, v.18, n.10, p. 915-921, oct. 2008.

ANDERSON, D. G.; CHIEGO, D. J. JR.; GLICKMAN, G. N.; MCCAULEY, L. K. A clinical assessment of the effects of 10% carbamide peroxide gel on human pulp tissue. **J Endod.**, Chicago, v. 24, n. 4, p. 247-250, apr. 1999.

ARMÊNIO, R. V.; FITARELLI, F.; ARMÊNIO, M. F.; DEMARCO, F. F.; REIS, A.; LOGUERCIO, A. D. The effect of fluoride gel use on bleaching sensitivity: a double-blind randomized controlled clinical trial. **J Am Dent Assoc.**, Chicago, v. 139, n. 5, p. 592-597, may. 2008.

AWAWDEH L.; LUNDY, F. T.; SHAW, C.; LAMEY, P. J.; LINDEN, G. J.; KENNEDY, J. G. Quantitative analysis of substance P, neurokinin A and calcitonin gene-related peptide in pulp tissue from painful and healthy human teeth. **Int Endod J.**, Oxford, v. 35, n. 1, p. 30–36, jan. 2002.

BASTING, R. T.; AMARAL, F. L.; FRANÇA, F. M.; FLÓRIO, F. M. Clinical comparative study of the effectiveness of and tooth sensitivity to 10% and 20% carbamide peroxide home-use and 35% and 38% hydrogen peroxide in-office bleaching materials containing desensitizing agents. **Oper Dent.**, United States, v. 37, n. 5, p. 464-473, sep-oct. 2012

BOUTAUD, O.; ARONOFF, D. M.; RICHARDSON, J. H.; MARNETT, L. J.; OATES, J. A. Determinants of the cellular specificity of acetaminophen as an inhibitor of prostaglandin H(2) synthases. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, Washington DC, v. 99, n. 10, p. 7130-7135, may. 2002.

BOWLES, W. H.; BURNS, H. JR. Catalase/peroxidase activity in dental pulp. **J Endod.**, Chicago, v. 18, n. 11, p. 527-534, nov. 1992.

BRAIN, S. D.; WILLIAMS, T. J.; TIPPINS, J. R.; MORRIS, H. R.; MACINTYRE, I. Calcitonin gene-related peptide is a potent vasodilator. **Nature.**, London, v. 313, n.5997, p. 54-56, jan. 1985.



BRISO, A. L.; GONÇALVES, R. S.; DE AZEVEDO, F. A.; GALLINARI, M. DE O.; DOS SANTOS, P. H.; FAGUNDES, T. C. Transenamel and Transdental Penetration of H₂O₂ in Restored Bovine Teeth. **J Adhes Dent.**, England, v. 17, n. 6; p. 529-534, de. 2015a

BRISO, A. L.; GONÇALVES, R. S.; COSTA, F. B.; GALLINARI, M. DE O.; CINTRA, L. T.; SANTOS, P. H. Demineralization and hydrogen peroxide penetration in teeth with incipient lesions. **Braz Dent J.**, São Paulo, v. 26, n. 2, p. 135-140, mar-apr. 2015b

CASASCO, A.; CALLIGARO, A.; CASASCO, M.; SPRINGALL, D. R.; POLAK, J. M.; POGGI, P.; MARCHETTI, C. Peptidergic nerves in human dental pulp. An immunocytochemical study. **Histochemistry.**, Berlin, v. 95, n. 2, p. 115-121. 1990.

CAVIEDES-BUCHELI, J.; LOMBANA, N.; AZUERO-HOLGUÍN, M. M.; MUNOZ, H. R. Quantification of neuropeptides (calcitonin gene-related peptide, substance P, neurokinin A, neuropeptide Y and vasoactive intestinal polypeptide) expressed in healthy and inflamed human dental pulp. **Int Endod J.**, Oxford, v. 39, n. 5, p. 394-400, may. 2006.

CAVIEDES-BUCHELI, J.; GUTIERREZ-GUERRA, J. E.; SALAZAR, F.; PICHARDO, D.; MORENO, G. C.; MUNOZ, H. R. Substance P receptor expression in healthy and inflamed human pulp tissue. **Int Endod J.**, Oxford, v. 40, n. 2, p. 106-111, feb. 2007.

CAVIEDES-BUCHELI, J.; ARIZA-GARCÍA, G.; RESTREPO-MÉNDEZ, S.; RÍOS-OSORIO, N.; LOMBANA, N.; MUÑOZ, H. R. The effect of tooth bleaching on substance P expression in human dental pulp. **J Endod.**, Chicago, v. 34, n. 12, p. 1462-1465, dec. 2008a.

CAVIEDES – BUCHELI, J.; MUÑOZ, H. R.; AZUERO – HOLGUÍN, M. M.; ULATE, E. Neuropeptides in dental pulp: the silent protagonists. **J Endod.**, Chicago, v. 34, n. 7, p. 773-788, jul. 2008b.

CINTRA, L. T.; BENETTI, F.; DA SILVA FACUNDO, A. C.; FERREIRA, L. L.; GOMES – FILHO, J. E.; ERVOLINO, E.; RAHAL, V.; BRISO, A. L. F. The number of bleaching sessions influence pulp tissue damage in rat teeth. **J Endod.**, Chicago, v. 39, n. 12, p. 1576-1580, dec. 2013.

CINTRA, L. T.; BENETTI, F.; FERREIRA, L. L.; RAHAL, V.; ERVOLINO, E.; JACINTO, RDE. C.; GOMES FILHO, J. E.; BRISO, A. L. F. Evaluation of an experimental rat model for comparative studies of bleaching agents. **J Appl Oral Sci.**, São Paulo, v. 24, n. 1, p. 95-104, feb. 2016a.

CINTRA, L. T. A.; BENETTI, F.; FERREIRA, L. L.; GOMES – FILHO, J. E.; ERVOLINO, E.; GALLINARI, M. O.; RAHAL, V.; BRISO, A. L. F. Penetration Capacity, Color



Alteration and Biological Response of Two In-office Bleaching Protocols. **Braz Dent J.**, São Paulo, v. 27, n. 2, p. 169-175, apr. 2016b.

COSTA, C. A.; RIEHL, H.; KINA, J. F.; SACONO, N. T.; HEBLING, J. Human pulp responses to in-office tooth bleaching. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.**, St. Louis, v. 109, n. 4, p. e59-e64, apr. 2010.

CROLL, T. P. Bleaching sensitivity. **J Am Dent Assoc.**, Chicago, v. 134, n. 9, p. 1172, sep. 2003.

DACHI, S. F.; STIGERS, R. W. Effects of prednisolone on the thermal sensitivity and pulp reactions of amalgam restored teeth. **J Am Dent Assoc.**, Chicago, v. 69, p. 565-571, nov. 1964

DE ALMEIDA, L. C.; COSTA, C. A.; RIEHL, H.; SANTOS, P. H.; SUNDFELD, R. H.; BRISO, A. L. Occurrence of sensitivity during at-home and in-office tooth bleaching therapies with or without use of light sources. **Acta Odontol Latinoam.**, Buenos Aires, v. 25, n. 1, p. 3-8. 2012.

DE ALMEIDA, L. C.; SOARES, D. G.; GALLINARI, M. O.; DE SOUZA COSTA, C. A.; DOS SANTOS, P. H.; BRISO, A. L. F. Color alteration, hydrogen peroxide diffusion, and cytotoxicity caused by in-office bleaching protocols. **Clin Oral Investig.**, Berlin, v. 19, n. 3, p. 673-680, apr. 2015a.

DE ALMEIDA, L. C.; SOARES, D. G.; AZEVEDO, F. A.; GALLINARI, M. O.; COSTA, C. A.; DOS SANTOS, P. H.; BRISO, A. L. F. At-Home Bleaching: Color Alteration, Hydrogen Peroxide Diffusion and Cytotoxicity. **Braz Dent J.**, São Paulo, v. 26, n. 4, p. 378-383, jul-aug. 2015b.

FERREIRA, S. H. Hiperalgesia inflamatoria, óxido nítrico y control periférico del dolor. **Rev Latino Americana de Dolor**, Buenos Aires, v. 12, n.2 , p. 6-17. 1995.

FRACON, R. N.; TEÓFILO, J. M.; MORIS, I. C.; LAMANO, T. Treatment with paracetamol, ketorolac or etoricoxib did not hinder alveolar bone healing: a histometric study in rats. **J Appl Oral Sci.**, São Paulo, v. 18, n. 6, p. 630-634, dec. 2010.

FRY, A. E.; WATKINS, R. F.; PHATAK, N. M. Topical use of corticosteroids for the relief of pain sensitivity of dentine and pulp. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol.**, St. Louis, v. 13, p. 594-597, may. 1960.

GINIGER, M.; MACDONALD, J.; ZIEMBA, S.; FELIX, H. The clinical performance of professionally dispensed bleaching gel with added amorphous calcium phosphate. **J Am Dent Assoc.**, Chicago, v. 136, n. 3, p. 383-392, mar. 2005.



GONÇALVES, R. S.; COSTA, C. A. C.; SOARES D. G.; DOS SANTOS, P. H.; CINTRAC L. T. A.; BRISO A. L. F. Effect of Different Light Sources and Enamel Preconditioning on Color Change, H₂O₂ Penetration, and Cytotoxicity in Bleached Teeth. **Oper Dent.** United States, v. 41, n. 1, p. 83-92, jan-feb. 2016.

GRAHAM, G. G.; DAVIES, M. J.; DAY, R. O.; MOHAMUDALLY, A.; SCOTT, K. F. The modern pharmacology of paracetamol: therapeutic actions, mechanism of action, metabolism, toxicity and recent pharmacological findings. **Inflammopharmacology.** Switzerland, v. 21, n. 3, p. 201-232, jun. 2013.

HARRISON, S.; GEPPETTI, P. Substance P. **Int J Biochem Cell Biol.**, Netherlands, v. 33, n. 6, p. 555-576, jun. 2001.]

HAYWOOD, V. B.; HEYMANN, H.O. Nightguard vital bleaching: How safe is it? **Quintessence Int.**, Berlin, v. 22, n. 7, p. 515-523, jul. 1991.

HAYWOOD, V. B. Treating sensitivity during tooth whitening. **Compend Contin Educ Dent.**, United States, v. 26, n. 9 Suppl 3, p. 11-20, sep. 2005.

HOLLAND, R.; OKABE, J. N.; SOUZA, V.; SALIVA, O. Diffusion of corticosteroid-antibiotic solutions through human dentine. **Rev. Odont. UNESP.**, São Paulo, v. 20, p. 17-23. 1991

HOLLAND, R.; OTOBONI FILHO, J. A.; DE SOUZA, V.; NERY, M. J.; BERNABÉ, P. F.; DEZAN JÚNIOR, E. Calcium hydroxide and a corticosteroid-antibiotic association as dressings in cases of biopulpectomy. A comparative study in dogs' teeth. **Braz Dent J.**, São Paulo, v. 9, n. 2, p. 67-76. 1998.

JORGENSEN, M. G.; CARROLL, W. B. Incidence of tooth sensitivity after home whitening treatment. **J Am Dent Assoc.**, Chicago, v. 133, n. 8, p. 1076-1082, aug. 2002.

KINA, J. F.; HUCK, C.; RIEHL, H.; MARTINEZ, T. C.; SACONO, N. T.; RIBEIRO, A. P.; COSTA, C. A. Response of human pulps after professionally applied vital tooth bleaching. **Int Endod J.**, Oxford, v. 43, n. 7, p. 572-580, jul. 2010.

LILLIE, R. D. **Histopathologic technique and practical histochemistry.** 2 ed. New York: Ed. Blakinston, 1954. 501p.

LUYK, N.H. ANDERSON, J.; WARD-BOOTH, R. P.. Corticosteroid therapy and the dental patient. **Brit Dent J.**, England, v. 159, n. 1, p. 12-17, jul. 1985

MACHADO, L. S.; ANCHIETA, R. B.; SANTOS, P. H.; BRISO, A. L. F.; TOVAR, N.; JANAL, M.; COELHO, P. G. Clinical Comparison of At-Home and In-Office Dental



Bleaching Procedures: A Randomized Trial of a Split-Mouth Design. **Int J Periodontics Restorative Dent.**, Chicago, v. 36, n. 2, p. 251-260, mar-apr. 2016.

MARSON, F. C.; GONÇALVES, R. S.; SILVA, C. O.; CINTRA, L. T.; PASCOTTO, R. C.; SANTOS, P. H.; BRISO, A. L. Penetration of hydrogen peroxide and degradation rate of different bleaching products. **Oper Dent.**, United States, v. 40, n. 1, p. 72-79, jan-feb. 2015.

MERIGHI, A.; POLAK, J. M.; GIBSON, S. J.; GULBENKIAN, S.; VALENTINO, K. L.; PEIRONE, S. M. Ultrastructural studies on calcitonin gene-related peptide-, tachykinins- and somatostatin-immunoreactive neurones in rat dorsal root ganglia: evidence for the colocalization of different peptides in single secretory granules. **Cell Tissue Res.**, Germany, v. 254, n. 1, p. 101-109, oct. 1988.

NELSON-FILHO, P.; LUCISANO, M. P.; DA SILVA, R. A.; DA SILVA, R. S.; SERRA, M. C.; GERLACH, R. F.; NETO, F. C.; CARNEIRO, Z. A.; ZAMARIOLI, A.; MORSE, L.; BATTAGLINO, R. Systemically alendronate was incorporated into dental tissues but did not cause morphological or mechanical changes in rats teeth. **Microsc Res Tech.**, New York, v. 75, n. 9, p. 1265-1271, sep. 2012.

OTSUKA, M.; YOSHIOKA, K. Neurotransmitter functions of mammalian tachykinins. **Physiol Rev.**, Washington, v. 73, n. 2, p. 229-308, apr. 1993.

PANZARINI, S. R.; TREVISAN, C. L.; BRANDINI, D. A.; POI, W. R.; SONODA, C. K.; LUVIZUTO, E. R.; DOS SANTOS, C. L. Intracanal dressing and root canal filling materials in tooth replantation: a literature review. **Dent Traumatol.**, Copenhagen, v. 28, n. 1, p. 42-48, feb. 2012.

PASHLEY, D. H. How can sensitive dentine become hypersensitive and can it be reversed? **J Dent.**, Bristol, v. 41, p. S49-S55, jul. 2013.

PERDIGÃO, J. Dental whitening – revisiting the myths. **Northwest Dent.**, St. Paul, v. 89, n. 6, p. 19-21, nov-dec. 2010.

PLENDERLEITH, M. B.; HALLER, C. J.; SNOW, P. J. Peptide coexistence in axon terminals within the superficial dorsal horn of the rat spinal cord. **Synapse.** New York, v. 6, n. 4, p. 344-350.1990.

RAHAL, V.; GALLINARI, M. O.; PERDIGAO, J.; CINTRA, L. T. A.; SANTOS, P. H.; BRISO, A. L. F. Quantitative sensory testing of the effect of desensitizing treatment after dental bleaching. **Acta Odontol. Latinoam.**, Buenos Aires, v. 28, n. 3, p. 263-270, dec. 2015.



SEALE, N. S.; MCINTOSH, J. E.; TAYLOR, A. N. Pulpal reaction to bleaching of teeth in dogs. **J Dent Res.**, Chicago, v. 60, n. 5, p. 948-953, may. 1981.

SEALE, N. S.; WILSON, C. F. Pulpal response to bleaching of teeth in dogs. **Pediatr Dent.**, Chicago, v. 7, n. 3, p. 209-214, sep.1985.

SILVA, F. B.; ALMEIDA, J. M.; SOUSA, S. M. Natural medicaments in endodontics - a comparative study of the anti-inflammatory action. **Braz Oral Res.**, São Paulo, v. 18, n. 2, p. 174-179, apr-jun. 2004.

SOARES, D. G.; BASSO, F. G.; HEBLING, J.; DE SOUZA COSTA, C. A. Concentrations of and application protocols for hydrogen peroxide bleaching gels: effects on pulp cell viability and whitening efficacy. **J Dent** ., Bristol, v. 42, n. 2, p. 185-190, feb. 2014a.

SOARES, D. G.; RIBEIRO, A. P. D.; BRISO, A. L. F.; HEBLING, J.; DE SOUZA COSTA, C. A. **Complexo dentinho-pulpar: fisiologia e resposta as injúrias: Uma abordagem multidisciplinar.** 1. ed. São Paulo: Artes Médicas, 2014b. 344p.

SOARES, D. G. **Novos Parâmetros para o clareamento dental: Avaliação da eficácia, citotoxicidade e efeitos moleculares.** 2014. 108 f. Tese (Doutorado em Reabilitação Oral) – Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista, Araraquara. 2014c.

SOUZA, V.; HOLLAND, R.; SOUZA, R. S. Resposta da polpa dental ao preparo cavitário e aplicação tópica de associações de corticosteróide-antibiótico no assoalho da cavidade. **Rev. Odontol. UNESP.** São Paulo, v. 25, n. 2, p. 181-192, jul-dez. 1996

SWIERKOSZ, T. A.; JORDAN, L.; MCBRIDE, M.; MCGOUGH, K.; DEVLIN, J.; BOTTING, R. M. Actions of paracetamol on cyclooxygenases in tissue and cell homogenates of mouse and rabbit. **Med Sci Monit.**, Poland, v. 8, n. 2, p. BR496-BR503, dec. 2002.

TAY, L. Y.; KOSE, C.; LOGUERCIO, A. D.; REIS, A. Assessing the effect of desensitizing agent used before in-office tooth bleaching. **J Am Dent Assoc.**, Chicago, v. 140, n. 10, p. 1245-1251, oct. 2009.

VIOLA, T. A. Combination ibuprofen and acetaminophen analgesic products for dental pain management. **Gen Dent.**, Chicago, v. 61, n. 7, p. 14-15, nov-dec. 2013.

WAKISAKA, S. Neuropeptides in the dental pulp: distribution, origins and correlation. **J Endod.**, Chicago, v. 16, n. 2, p. 67-69, feb. 1990.



WILLIAMS, H. A.; RUEGGERBERG, F. A.; MEISTER, L. W. Bleaching the natural dentition to match the color of existing restorations: case reports. **Quintessence Int.**, Berlin, v. 23, n. 10, p. 673-677, oct. 1992.





*A*nexos

ANEXO 1 – Certificado do Comissão de Ética de Pesquisa em Animal.



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

CAMPUS ARAÇATUBA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA



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

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado "Influência do uso de substâncias tópicas e sistêmicas na inflamação e na expressão de neuropeptídeos pró-inflamatórios após o tratamento clareador", Processo FOA nº 2014-00817, sob responsabilidade de André Luiz Fraga Briso apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 02 de Setembro de 2014.

VALIDADE DESTES CERTIFICADO: 28 de Fevereiro de 2016.

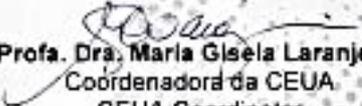
DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 28 de Março de 2016.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled "Influence of the use of topical and systemic substances in inflammation and in the pro-inflammatory neuropeptides expression after bleaching treatment", Protocol FOA nº 2014-00817, under the supervision of André Luiz Fraga Briso presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on September 02, 2014.

VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: February 28, 2016.

DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: March 28, 2016.



Prof. Dra. Maria Gisela Laranjeira
Coordenadora da CEUA
CEUA Coordinator

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



Anexo 2 –Escore e medianas atribuídos na análise histológica em cada terço coronário para todos os grupos controles.

	Escore	Controle			Otosporin®			Tylenol®			
		0h	24h	48h	0h	24h	48h	0h	24h	48h	
Coroa	Terço oclusal	1	7/7	7/7	7/7	7/7	7/7	7/7	7/7	7/7	7/7
		2	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7
		3	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7
		4	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7
		5	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7
	Mediana	1 Aa									
	Terço médio	1	7/7	7/7	7/7	7/7	7/7	7/7	7/7	7/7	7/7
		2	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7
		3	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7
		4	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7
		5	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7
	Mediana	1 Aa									
	Terço cervical	1	7/7	7/7	7/7	7/7	7/7	7/7	7/7	7/7	7/7
		2	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7
		3	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7
4		0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	
5		0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	
Mediana	1 Aa	1 Aa	1 Aa	1 Aa	1 Aa	1 Aa	1 Aa	1 Aa	1 Aa	1 Aa	
Raiz	Terço coronário	1	7/7	7/7	7/7	7/7	7/7	7/7	7/7	7/7	7/7
		2	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7
		3	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7
		4	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7
		5	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7
	Mediana	1 Aa									
	Terço médio	1	7/7	7/7	7/7	7/7	7/7	7/7	7/7	7/7	7/7
		2	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7
		3	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7
		4	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7
		5	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7
	Mediana	1 Aa									
	Terço apical	1	7/7	7/7	7/7	7/7	7/7	7/7	7/7	7/7	7/7
		2	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7
		3	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7
4		0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	
5		0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	
Mediana	1 Aa	1 Aa	1 Aa	1 Aa	1 Aa	1 Aa	1 Aa	1 Aa	1 Aa	1 Aa	



Anexo 3 – Escores e medianas atribuídos na análise histológica em cada terço coronário e radicular para todos os grupos clareados.

		Controle			Whiteness HP Maxx 35%			Whiteness HP Maxx 35% + Otosporin®			Whiteness HP Maxx 35% + Tylenol®			
		Escores	0h	24h	48h	0h	24h	48h	0h	24h	48h	0h	24h	48h
Coroa	Terço oclusal	1	7/7	7/7	7/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7
		2	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7
		3	0/7	0/7	0/7	0/7	2/7	3/7	0/7	6/7	6/7	0/7	3/7	3/7
		4	0/7	0/7	0/7	0/7	5/7	4/7	5/7	1/7	1/7	2/7	4/7	4/7
		5	0/7	0/7	0/7	7/7	0/7	0/7	2/7	0/7	0/7	5/7	0/7	0/7
		Mediana	1 Ab	1 Ab	1 Ab	5 Aa	4 Ba	4 Ba	4 Aab	3 Bab	3 Bab	5 Aa	4 Ba	4 Ba
	Terço médio	1	7/7	7/7	7/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7
		2	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	4/7	5/7	0/7	1/7	2/7
		3	0/7	0/7	0/7	0/7	6/7	3/7	0/7	3/7	2/7	2/7	6/7	5/7
		4	0/7	0/7	0/7	0/7	1/7	0/7	7/7	0/7	0/7	3/7	0/7	0/7
		5	0/7	0/7	0/7	7/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	2/7	0/7	0/7
		Mediana	1 Ab	1 Ab	1 Ab	5 Aa	3 Ba	3 Ba	4 Aab	2 Bab	2 Bab	4 Aa	3 ABa	3 Ba
	Terço cervical	1	7/7	7/7	7/7	0/7	0/7	0/7	0/7	3/7	3/7	0/7	0/7	0/7
		2	0/7	0/7	0/7	0/7	5/7	6/7	0/7	4/7	4/7	1/7	4/7	5/7
		3	0/7	0/7	0/7	0/7	2/7	1/7	6/7	0/7	0/7	1/7	3/7	2/7
4		0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	1/7	0/7	0/7	5/7	0/7	0/7	
5		0/7	0/7	0/7	7/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	
	Mediana	1 Ab	1 Ab	1 Ab	5 Aa	2 Ba	2 Ba	3 Aab	2 Bab	2 Ba	4 Aa	2 Ba	2 Ba	
Raiz	Terço coronário	1	7/7	7/7	7/7	0/7	7/7	4/7	0/7	5/7	5/7	0/7	4/7	5/7
		2	0/7	0/7	0/7	1/7	0/7	3/7	4/7	2/7	2/7	1/7	3/7	2/7
		3	0/7	0/7	0/7	1/7	0/7	0/7	3/7	0/7	0/7	5/7	0/7	0/7
		4	0/7	0/7	0/7	5/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	1/7	0/7	0/7
		5	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7
		Mediana	1 Ab	1 Aa	1 Aa	4 Aa	1 Ba	1 Ba	2 Aab	1 Ba	1 Ba	3 Aa	1 Ba	1 Ba
	Terço médio	1	7/7	7/7	7/7	0/7	6/7	7/7	5/7	7/7	7/7	1/7	7/7	7/7
		2	0/7	0/7	0/7	2/7	1/7	0/7	2/7	0/7	0/7	5/7	0/7	0/7
		3	0/7	0/7	0/7	5/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	1/7	0/7	0/7
		4	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7
		5	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7
		Mediana	1 Ab	1 Aa	1 A	2 Aa	1 Ba	1 Ba	1 Ab	1 Aa	1 Aa	2 Aa	1 Ba	1 Ba
	Terço apical	1	7/7	7/7	7/7	7/7	7/7	7/7	7/7	7/7	7/7	6/7	7/7	7/7
		2	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	1/7	0/7	0/7
		3	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7
4		0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	
5		0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	
	Mediana	1 Aa	1 Aa	1 Aa	1 Aa	1 Aa	1 Aa	1 Aa	1 Aa	1 Aa	1 Aa	1 Aa	1 Aa	



Anexo 4 – Escores e medianas atribuídos à imunomarcagem da SP em cada terço coronário e radicular para todos os grupos controles.

	Escore	Controle			Otosporin®			Tylenol®			
		0h	24h	48h	0h	24h	48h	0h	24h	48h	
Coroa	Terço oclusal	1	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7
		2	7/7	7/7	7/7	7/7	7/7	7/7	7/7	7/7	7/7
		3	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7
		4	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7
		5	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7
		Mediana	2 Aa								
	Terço médio	1	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7
		2	7/7	7/7	7/7	7/7	7/7	7/7	7/7	7/7	7/7
		3	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7
		4	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7
		5	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7
		Mediana	2 Aa								
	Terço cervical	1	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7
		2	7/7	7/7	7/7	7/7	7/7	7/7	7/7	7/7	7/7
		3	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7
4		0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	
5		0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	
	Mediana	2 Aa	2 Aa	2 Aa	2 Aa	2 Aa	2 Aa	2 Aa	2 Aa	2 Aa	
Raiz	Terço coronário	1	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7
		2	7/7	7/7	7/7	7/7	7/7	7/7	7/7	7/7	7/7
		3	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7
		4	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7
		5	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7
		Mediana	2 Aa								
	Terço médio	1	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7
		2	7/7	7/7	7/7	7/7	7/7	7/7	7/7	7/7	7/7
		3	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7
		4	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7
		5	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7
		Mediana	2 Aa								
	Terço apical	1	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7
		2	7/7	7/7	7/7	7/7	7/7	7/7	7/7	7/7	7/7
		3	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7
4		0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	
5		0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	
	Mediana	2 Aa	2 Aa	2 Aa	2 Aa	2 Aa	2 Aa	2 Aa	2 Aa	2 Aa	



Anexo 5 – Escores atribuídos à imunomarcção da CGRP em cada terço coronário e radicular para todos os grupos controles.

		Escore	Controle			Otosporin®			Tylenol®		
			0h	24h	48h	0h	24h	48h	0h	24h	48h
Coroa	Terço oclusal	1	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7
		2	7/7	7/7	7/7	7/7	7/7	7/7	7/7	7/7	7/7
		3	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7
		4	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7
		5	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7
		Mediana	2 Aa								
	Terço médio	1	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7
		2	7/7	7/7	7/7	7/7	7/7	7/7	7/7	7/7	7/7
		3	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7
		4	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7
		5	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7
		Mediana	2 Aa								
	Terço cervical	1	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7
		2	7/7	7/7	7/7	7/7	7/7	7/7	7/7	7/7	7/7
		3	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7
4		0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	
5		0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	
Mediana		2 Aa	2 Aa	2 Aa	2 Aa	2 Aa	2 Aa	2 Aa	2 Aa	2 Aa	2 Aa
Raiz	Terço coronário	1	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7
		2	7/7	7/7	7/7	7/7	7/7	7/7	7/7	7/7	7/7
		3	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7
		4	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7
		5	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7
		Mediana	2 Aa								
	Terço médio	1	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7
		2	7/7	7/7	7/7	7/7	7/7	7/7	7/7	7/7	7/7
		3	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7
		4	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7
		5	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7
		Mediana	2 Aa								
	Terço apical	1	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7
		2	7/7	7/7	7/7	7/7	7/7	7/7	7/7	7/7	7/7
		3	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7
4		0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	
5		0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	
Mediana		2 Aa	2 Aa	2 Aa	2 Aa	2 Aa	2 Aa	2 Aa	2 Aa	2 Aa	



Anexo 6 – Escores atribuídos à imunomarcção da SP em cada terço coronário e radicular para todos os grupos clareados.

		Controle			Whiteness HP Maxx 35%			Whiteness HP Maxx 35% + Otosporin®			Whiteness HP Maxx 35% + Tylenol®			
Escore		0h	24h	48h	0h	24h	48h	0h	24h	48h	0h	24h	48h	
Coroa	Terço oclusal	1	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7
		2	7/7	7/7	7/7	0/7	0/7	0/7	0/7	3/7	7/7	0/7	0/7	7/7
		3	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	7/7	0/7	4/7	0/7	0/7	7/7	0/7
		4	0/7	0/7	0/7	0/7	7/7	0/7	4/7	0/7	0/7	3/7	0/7	0/7
		5	0/7	0/7	0/7	7/7	0/7	0/7	3/7	0/7	0/7	4/7	0/7	0/7
		Mediana	2 Ab	2 Ab	2 Ab	5 Aa	4 ABa	3 Ba	4 Aab	3 ABab	2 Bb	5 Aab	3 ABab	2 Bb
	Terço médio	1	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7
		2	7/7	7/7	7/7	0/7	0/7	4/7	0/7	7/7	7/7	0/7	3/7	7/7
		3	0/7	0/7	0/7	0/7	3/7	3/7	1/7	0/7	0/7	0/7	4/7	0/7
		4	0/7	0/7	0/7	0/7	4/7	0/7	6/7	0/7	0/7	4/7	0/7	0/7
		5	0/7	0/7	0/7	7/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	3/7	0/7	0/7
		Mediana	2 Ab	2 Ab	2 Ab	5 Aa	4 ABa	2 Ba	4 Aab	2 Bb	2 Bb	4 Ab	3 ABab	2 Bb
	Terço cervical	1	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7
		2	7/7	7/7	7/7	0/7	0/7	7/7	0/7	7/7	7/7	0/7	7/7	7/7
		3	0/7	0/7	0/7	0/7	7/7	0/7	7/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7
4		0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	7/7	0/7	0/7	
5		0/7	0/7	0/7	7/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	
Mediana		2 Ab	2 Ab	2 Ab	5 Aa	3 ABa	2 Bb	3 Ab	2 Bab	2 Bb	4 Aab	2 Bab	2 Bb	
Raiz	Terço coronário	1	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	
		2	7/7	7/7	7/7	0/7	0/7	0/7	0/7	7/7	7/7	7/7	7/7	
		3	0/7	0/7	0/7	2/7	7/7	7/7	7/7	0/7	0/7	0/7	0/7	
		4	0/7	0/7	0/7	5/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	
		5	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	
		Mediana	2 Ab	2 Ab	2 Aa	4 Aa	3 ABa	3 Ba	3 Ab	2 Ab	2 Aa	2 Ab	2 Aab	2 Aa
	Terço médio	1	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7
		2	7/7	7/7	7/7	0/7	7/7	7/7	7/7	7/7	7/7	7/7	7/7	7/7
		3	0/7	0/7	0/7	3/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7
		4	0/7	0/7	0/7	4/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7
		5	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7
		Mediana	2 Ab	2 Aa	2 Aa	4 Aa	2 Ba	2 Ba	2 Ab	2 Aa	2 Aa	2 Ab	2 Aa	2 Aa
	Terço apical	1	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7
		2	7/7	7/7	7/7	0/7	0/7	0/7	0/7	3/7	7/7	0/7	0/7	7/7
		3	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	7/7	0/7	4/7	0/7	0/7	7/7	0/7
4		0/7	0/7	0/7	0/7	7/7	0/7	4/7	0/7	0/7	3/7	0/7	0/7	
5		0/7	0/7	0/7	7/7	0/7	0/7	3/7	0/7	0/7	4/7	0/7	0/7	
Mediana		2 Ab	2 Ab	2 Ab	5 Aa	4 ABa	3 Ba	4 Aab	3 ABab	2 Bb	5 Aab	3 ABab	2 Bb	



Anexo 7 – Escores atribuídos à imunomarcção da CGRP em cada terço coronário e radicular para todos os grupos clareados.

		Controle			Whiteness HP Maxx 35%			Whiteness HP Maxx 35% + Otosporin®			Whiteness HP Maxx 35% + Tylenol®			
		0h	24h	48h	0h	24h	48h	0h	24h	48h	0h	24h	48h	
Coroa	Terço oclusal	1	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7
		2	7/7	7/7	7/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	7/7	0/7	0/7	7/7
		3	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	7/7	0/7	7/7	0/7	0/7	7/7	0/7
		4	0/7	0/7	0/7	0/7	7/7	0/7	4/7	0/7	0/7	4/7	0/7	0/7
		5	0/7	0/7	0/7	7/7	0/7	0/7	3/7	0/7	0/7	3/7	0/7	0/7
		Mediana	2 Ab	2 Ab	2 Ab	5 Aa	4 ABa	3 Ba	4 Aab	3 ABab	2 Bb	4 Aab	3 ABab	2 Bb
	Terço médio	1	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7
		2	7/7	7/7	7/7	0/7	0/7	4/7	0/7	3/7	7/7	0/7	0/7	7/7
		3	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	3/7	1/7	4/7	0/7	0/7	7/7	0/7
		4	0/7	0/7	0/7	0/7	7/7	0/7	6/7	0/7	0/7	4/7	0/7	0/7
		5	0/7	0/7	0/7	7/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	3/7	0/7	0/7
		Mediana	2 Ab	2 Ab	2 Aa	5 Aa	4 ABa	2 Ba	4 Aab	3 ABab	2 Ba	4 Aab	3 ABab	2 Ba
	Terço cervical	1	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7
		2	7/7	7/7	7/7	0/7	0/7	7/7	0/7	7/7	7/7	0/7	4/7	7/7
		3	0/7	0/7	0/7	0/7	3/7	0/7	7/7	0/7	0/7	0/7	3/7	0/7
4		0/7	0/7	0/7	0/7	4/7	0/7	0/7	0/7	0/7	7/7	0/7	0/7	
5		0/7	0/7	0/7	7/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	
Mediana		2 Ac	2 Aa	2 Aa	5 Aa	4 ABa	2 Ba	3 Abc	2 Bb	2 Ba	4 Aab	2 ABab	2 Ba	
Raiz	Terço coronário	1	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	
		2	7/7	7/7	7/7	0/7	0/7	0/7	0/7	7/7	7/7	1/7	7/7	7/7
		3	0/7	0/7	0/7	2/7	7/7	7/7	7/7	0/7	0/7	6/7	0/7	0/7
		4	0/7	0/7	0/7	5/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7
		5	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7
		Mediana	2 Ab	2 Ab	2 Aa	4 Aa	3 ABa	3 Ba	3 Ab	2 Ab	2 Aa	3 Aab	2 Aab	2 Aa
	Terço médio	1	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7
		2	7/7	7/7	7/7	0/7	7/7	7/7	7/7	7/7	7/7	7/7	7/7	7/7
		3	0/7	0/7	0/7	3/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7
		4	0/7	0/7	0/7	4/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7
		5	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7
		Mediana	2 Ab	2 Aa	2 Aa	4 Aa	2 Ba	2 Ba	2 Ab	2 Aa	2 Aa	2 Ab	2 Aa	2 Aa
	Terço apical	1	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7
		2	7/7	7/7	7/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	7/7	0/7	0/7	7/7
		3	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	7/7	0/7	7/7	0/7	0/7	7/7	0/7
4		0/7	0/7	0/7	0/7	7/7	0/7	4/7	0/7	0/7	4/7	0/7	0/7	
5		0/7	0/7	0/7	7/7	0/7	0/7	3/7	0/7	0/7	3/7	0/7	0/7	
Mediana		2 Ab	2 Ab	2 Ab	5 Aa	4 ABa	3 Ba	4 Aab	3 ABab	2 Bb	4 Aab	3 ABab	2 Bb	



Anexo 8 – Preparo das soluções utilizadas na técnica imunohistoquímica

a) Tampão PBS:

Para 4 litros de PBS:

1ª opção: 10,52g de Fosfato de sódio monobásico (0,2M de $\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)

46,0g de Fosfato de sódio dibásico anidro (0,2M de Na_2HPO_4)

2ª opção: 10,52g de Fosfato de sódio monobásico (0,2M de $\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)

86,80g de Fosfato de sódio dibásico heptahidratado (0,2M de $\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)

b) PBS-TX:

Para cada 2000mL de PBS adicionar 1 mL de triton-X-100

c) Solução fixadora: PFA 4%

Para fazer 2 litros de PFA 4%:

– Solução 1:

Em 1 litro de água destilada adicionar: 80g de PFA

4g de NaOH

1. Aquecer 500mL de água destilada até atingir 65°C

2. Acrescentar NaOH e esperar dissolver

3. Esperar a temperatura chegar até 60°C e adicionar aos poucos o PFA

4. Completar até 1L com água destilada

– Solução 2: 1 litro de tampão PBS

Misturar a mesma quantidade das duas soluções (1 litro) e em seguida filtrar.

d) Solução desmineralizadora: EDTA 10%

Para fazer 2 litros de EDTA 10%:



