

NATHALIA BIAVA DE MENEZES

EFEITO DO PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO A 20% EM POLPA HUMANA

CAMPO GRANDE

2015

NATHALIA BIAVA DE MENEZES

EFEITO DO PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO A 20% EM POLPA HUMANA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia “Prof. Albino Coimbra Filho” da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, para obtenção do título de Mestre.

Área de concentração: Clínica Odontológica

Orientadora: Prof^a. Dr^a Cármen Regina Coldebella

CAMPO GRANDE

2015

FOLHA DE APROVAÇÃO

NATHALIA BIAVA DE MENEZES

EFEITO DO PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO A 20% EM POLPA HUMANA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia “Prof. Albino Coimbra Filho” da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, para obtenção do título de Mestre.

Área de concentração: Clínica Odontológica

Resultado Aprovada

Campo Grande (MS), 03 de Julho de 2015.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Cármen Regina Coldebella

Instituição UFMS

Profa. Benícia Carolina Iaskieviscz Ribeiro

Instituição UFMS

Prof. Key Fabiano Souza Pereira

Instituição UFMS

DEDICATÓRIA

Aos meus pais por todo incentivo, amor, dedicação e exemplo para que o meu sonho se concretizasse.

Ao meu filho para que ele se inspire e busque no estudo o alicerce para uma boa profissão.

Aos colegas de profissão para que possa inspirar novas pesquisas.

AGRADECIMENTOS

-A Deus por ter tido todas as oportunidades que me trouxeram até aqui.

-À minha orientadora, Prof.^a Cármen Regina Coldebella, que me proporcionou conhecimento, experiência, paciência e dividindo seu tempo para que esse trabalho se concretizasse.

-Aos meus pacientes, pois sem a dedicação, paciência e doação dos dentes, jamais eu teria os dados necessários para a pesquisa.

-Aos meus pais, irmãs, filho e namorado por terem tido a compreensão, amor e paciência para que eu tivesse forças para alcançar minhas metas.

-Ao técnico de laboratório Cláudio e as professoras da Histologia Simone Bertozi e Daniella Moraes, aos companheiros de mestrado, enfim todos que direta ou indiretamente me ajudaram na realização deste trabalho.

-Ao Programa de Pós-graduação em Odontologia, através de seus professores e funcionários, que possibilitaram a realização do projeto. À bolsa Capes que durante um ano financiou a pesquisa.

“Se a provocação te busca,

Não desanimes. Segue...

O dever a cumprir

É refúgio a guardar-te.

No calor do serviço

A sombra se desfaz.

O buril contra a pedra

É a força que a promove

A dor aproveitada

É sempre amparo oculto.

Sofre com paciência,

Deus te oferta o melhor.”

(Emmanuel- Livro: Deus sempre; Francisco Cândido Xavier)

RESUMO

EFEITO DO PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO A 20% EM POLPA HUMANA. Campo Grande; 2014. [Dissertação - Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul].

Quando o assunto é clareamento dental, logo surge a idealização do sorriso branco. Contudo, há outros aspectos a serem abordados que vão além da estética. A proposta desse projeto foi avaliar o efeito do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) a 20% em polpa dos incisivos inferiores humanos. Foram observadas a desorganização do tecido pulpar, a resposta inflamatória celular e a espessura dental. Por meio de um estudo clínico, randomizado e cego, do tipo boca dividida, foram selecionados três pacientes de ambos os sexos (38-60 anos) com, no mínimo, dois incisivos inferiores ($n=8$) vitais com indicação de exodontia por motivos periodontais ou protéticos. Entre os dois dentes, um foi controle e, o outro recebeu o agente clareador, conforme as instruções do fabricante. Dois dias após o término do tratamento clareador, os dentes foram extraídos e radiografados para medir a espessura esmalte-dentina. Depois, receberam o processamento histológico para confecção das lâminas em hematoxilina e eosina. Através de microscopia de luz e Microsistema Leica DM5500B classificou-se por meio de escore em relação ao grau de resposta inflamatória e desorganização celular. Após tabelados, os dados receberam o teste estatístico Mann-Whitney com nível de significância de 5%. Observou-se de leve a moderada resposta celular inflamatória e de pouca a total desorganização tecidual pulpar no grupo clareado em relação ao controle. A espessura de esmalte-dentina foi de $2,44 \pm 0,4$ mm. Concluiu-se que o H_2O_2 a 20% em incisivos inferiores humanos causou alterações pulpares significativas após três sessões de clareamento.

Palavras-chave: Clareamento dental; Peróxido de hidrogênio; Polpa dentária.

ABSTRACT

THE HYDROGEN PEROXIDE 20% EFFECT IN HUMAN PULP. Campo Grande; 2014. [Dissertação - Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul].

When it comes to teeth whitening, the idealization of white smile comes. However, there are other aspects to be addressed beyond aesthetics. The purpose of this study was to evaluate the effect of hydrogen peroxide (H_2O_2) 20% in human pulps of the mandibular incisors. The disorganization of the pulp tissue, the cellular inflammatory response and dental thick were observed. It was selected three patients of both sexes (38-60 years) through a blind split-mouth type randomized clinical study. All of them had at least two vital lower incisors with extraction indication due to periodontal or prosthetic reasons. Between the two teeth, one was the control and the other received the bleaching treatment according to the manufacturer's instructions. Two days after the bleaching treatment, the teeth were extracted and x-ray were performed to measure the enamel-dentin thickness. The histological processing were conducted for slide preparation with hematoxylin and eosin. A ranking was made through the light and Leica Microsystems DM5500B microcopy by the score of the inflammatory response and cellular disorganization degree. After being tabulated, data received the Mann-Whitney statistical test at 5% significance level. It was observed mild to moderate inflammatory cell response and low to total pulp tissue disruption in the bleached group when compared to the control. The enamel-dentin thickness was $2,44\pm 0,4\text{mm}$. It was concluded that H_2O_2 20% in human mandibular incisors has caused pulp significant changes after three bleaching sessions.

Key words: Tooth whitening; Hydrogen peroxide; Dental pulp

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Distribuição da amostra e grupos de participantes.....	30
Tabela 2 – Escore atribuído à resposta celular inflamatória.....	33
Tabela 3 – Escore atribuído à desorganização tecidual pulpar.....	33
Tabela 4 - Frequência absoluta (n) observada em ambos os eventos histopatológicos de acordo com os grupos categorizada por escores.....	35
Tabela 5 - Escores mínimos, máximos e mediana do grupo controle e clareado em relação a resposta celular inflamatória.....	35
Tabela 6 - Escores mínimos, máximos e mediana do grupo controle e clareado em relação a desorganização tecidual pulpar.....	36
Tabela 7 - Espessura esmalte e dentina do terço médio da face vestibular, escore segundo resposta celular inflamatória e desorganização tecidual pulpar e o tratamento aplicado na amostra.....	37

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Whiteness HP 20% da FGM Produtos Odontológicos Ltda, Joinvile, PR, Brasil.....30

Figura 2 - Imagem da radiografia digital com a amostra em posição, com a face mesial voltada para a incidência do feixe radiográfico. Barra de trabalho do programa Digora® fmx software 2.5, com as três medidas de esmalte-dentina no terço médio da face vestibular.....32

Figura 3 - **A**, incisivo inferior grupo controle. HE, X20. **B**, P polpa central grupo controle. HE, X40. **C**, incisivo inferior grupo clareado do mesmo paciente, tecido pulpar com moderada quantidade de infiltrado inflamatório (leucócitos mononucleares) comparado ao grupo controle. HE, X20. **D**, clareado em maior aumento com a camada de odontoblastos, a zona livre de células e a zona rica em células com grande quantidade de linfócitos, somente a polpa central (P) não possui infiltrado. HE, X40. (Leica DM5500B).....36

Figura 4 – **A**, incisivo pertencente a grupo controle, D, dentina; PD, pré-dentina; OB, camada de odontoblastos; CR, zona rica em células; P, polpa central. HE, X40. **B**, incisivo clareado do mesmo paciente, grande desorganização da camada odontoblástica, leve infiltrado inflamatório crônico, e total desorganização da morfologia pulpar. HE, X40. (Leica DM5500B).....37

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
GC	Grupo controle
GE	Grupo experimental
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HE	Hematoxilina e eosina

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	12
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	15
2.1 Difusão do agente clareador.....	15
2.2 Ativação química.....	18
2.3 Resposta pulpar.....	19
2.4 Mecanismos de proteção pulpar.....	21
2.5 Mudanças de protocolos.....	25
3 OBJETIVOS.....	28
3.1 Objetivo geral.....	28
3.2 Objetivos específicos.....	28
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	29
4.1 Delineamento do estudo.....	29
4.2 Seleção da amostra.....	29
4.3 Procedimento clareador.....	29
4.4 Procedimento cirúrgico.....	31
4.5 Preparo dos dentes	31
4.6 Procedimento histológico dos dentes.....	32
4.7 Análise dos dados.....	34
5 RESULTADOS.....	35
6 DISCUSSÃO.....	38
7 CONCLUSÃO.....	42
REFERÊNCIAS.....	43
ANEXO A.....	49

1 INTRODUÇÃO

A mídia e os padrões de beleza exibem um sorriso cada vez mais estético, harmônico e branco. Os dentes podem apresentar diferentes graus de escurecimento, por pigmentações extrínsecas e/ou intrínsecas. Para remover algumas manchas extrínsecas a raspagem e polimento dos dentes é a conduta preconizada. Enquanto que para as intrínsecas o clareamento dental é uma das possibilidades de tratamento conservador (DAHL; PALLESEN, 2003).

Existem várias técnicas clareadoras para dentes vitais: de uso ambulatorial, o doméstico supervisionado pelo profissional e os produtos de venda livre para o consumidor. O agente clareador utilizado deve ser escolhido levando-se em consideração o tipo de mancha, o quanto escuro é o dente inicialmente, o tempo disponível do paciente para o tratamento e a existência de sensibilidade dental prévia (DAHL; PALLESEN, 2003; SULIEMAN, 2005; CAMPOS *et al.*, 2011).

Há no mercado diversos produtos clareadores com diferentes concentrações (de 6,5 a 38%) e composições, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o peróxido de carbamida (SULIEMAN, 2005) entre outros. O resultado do clareamento varia de acordo com a concentração do agente clareador, a capacidade deste reagir com as moléculas cromóforas do dente, o tempo de aplicação e quantidade de sessões (DAHL; PALLESEN, 2003).

Além disso, o sucesso do tratamento é diretamente proporcional à penetração através do esmalte e dentina pelo agente clareador (RODRIGUES *et al.*, 2009). Apesar do esmalte dental ser altamente mineralizado, possui microespaços que permitem a passagem de substâncias, incluindo o agente clareador (CAMPOS *et al.*, 2011; KWON *et al.*, 2012). A difusão dos mesmos através da dentina depende de seus componentes e da sua concentração (HANNING *et al.*, 2011). Esse fluxo de difusão é proporcional à área de exposição, mas é inversamente proporcional a espessura da dentina (HANKS *et al.*, 1993).

Considerando que há a penetração dos componentes do gel clareador e que esses são citotóxicos às células da polpa dentária, a penetração do agente clareador, seja o peróxido de carbamida ou o peróxido de hidrogênio, vem sendo avaliada quanto ao seu efeito citotóxico, em dentes pré-molares e molares *in vitro* e *in vivo* ou em tecidos simulando a polpa (HANKS *et al.*, 1993; BENETTI *et al.*, 2004; LEE *et al.*, 2006; CAMARGO *et al.*, 2007; CARRASCO *et al.*, 2008; BERNARDON *et al.*, 2010; COSTA *et al.*, 2010).

Em cultura de células, o H₂O₂ na concentração de 20% e de 38% causa em média redução de 96% do metabolismo celular. O H₂O₂ a 20% promove a morte de algumas células, enquanto a 38% além da morte celular causa grandes alterações morfológicas nas células remanescentes (SACONO *et al.*, 2010).

Já foi constatado que a toxicidade é influenciada pelo tempo de exposição da superfície dental ao agente e a sua concentração (BENETTI *et al.*, 2004, TORRES *et al.*, 2013). Sendo estes diretamente proporcionais a queda na atividade enzimática celular (HANKS *et al.*, 1993). Nesse processo, há aumento do fluxo sanguíneo e, conseqüente, edema (HARGREAVES *et al.*, 2009). Os tecidos duros dentais impedem que esse edema se difunda, causando compressão do tecido pulpar e conseqüente dano tecidual, como dor e sensibilidade (BOWLES; BURNS, 1992).

Apesar de diversos estudos avaliarem a difusão do peróxido de hidrogênio através do esmalte e dentina, poucos comparam a espessura dental com a toxicidade. Ubaldini *et al.*, em 2013, *in vitro* observaram que após 10 minutos de aplicação de H₂O₂ a 25% já havia peróxido na junção polpa dentina. Além disso, constataram que quanto menor a espessura esmalte e dentina maior foi a penetração do gel. A conseqüência dessa proximidade pode ser observada como reações inflamatórias e alterações pulpares (COSTA *et al.*, 2010).

Buscando explicar e minimizar os efeitos colaterais, diversas pesquisas foram realizadas com dentes bovinos (BENETTI *et al.*, 2004; COLDEBELLA *et al.*, 2009; SACONO *et al.*, 2010; PONTES *et al.*, 2012), dentes bovinos e humanos (CAMARGO *et al.*, 2007) ou com dentes humanos *in vitro* e *ex-vivo* (BOWLES; BURNS, 1992; MICHIDA *et al.*, 2009; HAHN *et al.*, 2013). Porém, estudos *in vitro* têm limitações e nem sempre correspondem aos resultados *in vivo*, pois o fluxo do fluido dentinário através da estrutura dental (MICHIDA *et al.*, 2009), a real ação de

enzimas de proteção pulpar (BOWLES; BURNS, 1992) não são simulados, dentre outros fatores orgânicos.

Dentre os trabalhos publicados, existe apenas um estudo que avaliou a inflamação em incisivos inferiores ao se utilizar H₂O₂ a 38% *in vivo* (COSTA *et al.*, 2010). Desta forma a proposta deste estudo é avaliar as alterações pulpares causadas pelo H₂O₂ a 20%.

2 REVISÃO DE LITERATURA

O clareamento dos dentes surgiu em 1861 com cloreto de cálcio e soda, ácido nítrico e sulfúrico, depois, em 1882, observou-se que o peróxido de hidrogênio utilizado como solução desinfetante e irrigadora promovia um branqueamento do dente. Em 1895, propôs-se o uso de corrente elétrica para acelerar o processo de liberação de oxigênio pela decomposição do peróxido de hidrogênio. A partir daí as propostas foram visando acelerar a reação, através de instrumentos aquecidos e fontes de luz. Para melhorar o efeito acrescentou-se o perborato de sódio. Klusmier de Fort Smith, em 1960, percebeu que, ao prescrever a seus pacientes o uso de um gel a base de peróxido de carbamida a 10% para tratamento de gengivite, os dentes destes apresentavam-se mais claros (HISKS, 1992). Em 1970, Cohen e Parkins constataram que o peróxido de hidrogênio diminuía as manchas por tetraciclina (BARATIERI *et al.*, 2005). Em 1989, Haywood e Heymann descreveram a técnica do clareamento doméstico com uso de moldeira. Já Hanosh, em 1992, propôs o peróxido de hidrogênio para uso em consultório com ativação dual (HISKS, 1992).

2.1 Difusão do agente clareador

Para entrar em contato com as moléculas cromóforas, o agente clareador deve penetrar através das estruturas dentais. Em 1993, Hanks *et al.*, avaliaram a difusão do agente clareador através da dentina e o risco do H₂O₂ a 3 e 10% e peróxido de carbamida a 10 e 15% induzir citotoxicidade pulpar em cultura de células. Primeiro mensuraram a resposta celular para as diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio. Depois avaliaram a quantidade de H₂O₂ que se difundiu em 0,5mm de dentina após a aplicação do gel clareador em sua superfície. Por último, compararam a quantidade difundida com a resposta celular a determinada concentração de peróxido. Em menos de quinze minutos houve difusão do H₂O₂ em 0,5mm de dentina de molares humanos, capaz de causar efeitos biológicos prejudiciais.

Benetti *et al.* (2004) avaliaram a penetração de agentes clareadores na câmara pulpar de dentes intactos e dentes restaurados com resina composta. Foram utilizados 60 incisivos laterais bovinos, divididos em seis grupos, três restaurados e três intactos, sendo três exposições. Um apenas à água destilada, outro exposto a peróxido de carbamida a 10% e o terceiro a peróxido de carbamida a 35% por 60 minutos. Observaram que quanto maior a concentração do agente clareador maior a penetração, principalmente, em dentes restaurados ($0,7897 \pm 0,3003 \mu\text{g}$), comparados aos intactos ($0,1310 \pm 0,0579 \mu\text{g}$). Os autores sugerem outros estudos *in vivo* e menores concentrações de agentes clareadores para dentes restaurados.

Os dentes estão constantemente expostos a moléculas/manchas de alimentos e drogas, sendo que esse acúmulo leva a alteração de cor dos dentes. Kwon *et al.* (2012) compararam a penetração da Rodamina B e Rodamina dextra-conjugada através do esmalte e dentina de dentes anteriores superiores *in vitro*. Esses corantes foram utilizados devido ao peso molecular da Rodamina B (479 g mol^{-1}) ser comparável ao do peróxido de hidrogênio e da Rodamina dextra-conjugada (70000 g mol^{-1}) ser comparável a moléculas orgânicas de pigmentos/manchas alimentares. Dezoito dentes foram imersos aleatoriamente em um dos corantes por 4, 7, 10 e 15 dias, depois foram seccionados e montados em lâminas para serem observados em microscópio a laser. Apesar de a Rodamina dextra-conjugada possuir alto peso molecular ela penetrou através do esmalte e da dentina até a polpa, assim como a Rodamina B, expostos de 7 a 15 dias. Os autores sugerem que no esmalte penetrou via espaços interprismáticos e na dentina pelos túbulos, mostrando o mecanismo de manchamento/branqueamento dental.

Segundo Ubaldini *et al.* (2013) após exposição por 10 minutos, o H_2O_2 a 25% penetra pelas estruturas dentais, acumulando se na junção dentina polpa. Foram utilizados 35 discos de esmalte e dentina de pré-molares inferiores humanos que variaram de 1 a 3 mm de espessura. Avaliaram a dinâmica da difusão, por meio do micro-espectroscopia Raman, do H_2O_2 através do esmalte e dentina e correlacionaram com alterações químicas estruturais na subsuperfície da dentina. A rápida passagem pelo esmalte sugere que o H_2O_2 não reagiu com os componentes do esmalte, diferente da dentina local onde se concentrou, mostrando sua afinidade pela porção orgânica.

Marson *et al.* (2015) avaliaram em diferentes tempos de aplicação (0, 15, 30 e 45 minutos) a degradação do H_2O_2 e sua penetração através das estruturas dentais. A degradação do H_2O_2 de cinco marcas diferentes: Opalescence Xtra Boost 38%, White Gold Office 35%, Whiteness HP Blue 35%, Whiteness HP Maxx 35%, e Lase Peroxide Sensy 35%, que variaram de 35% e 38 %, foi medida pela reação com permanganato de potássio (0,2gr oxalato de potássio, 250ml água destilada, 15ml ácido sulfúrico a 80°C por 30 minutos). Para quantificar a penetração de H_2O_2 foram confeccionadas câmaras pulpares artificiais com 75 discos de esmalte-dentina (3,5mm) de incisivos bovinos. As análises foram realizadas pela reação do H_2O_2 com violeta genciana catalisada por peroxidase, sua intensidade aferida por espectrofotômetro. A menor concentração e penetração do H_2O_2 foi observada com Whiteness HP Maxx 35%. Os géis clareadores mantiveram 86% da concentração do peróxido inicial após 45 minutos, sugerindo que não haveria necessidade de reaplicá-los durante as sessões. Os autores também verificaram que todos os produtos penetraram rapidamente nas estruturas dentais, sendo tempo-dependente.

Almeida *et al.* (2015) avaliaram o efeito, a difusão e a citotoxicidade do H_2O_2 a 35% e a 20% comparados ao controle que não recebeu tratamento clareador. Discos de esmalte-dentina de 3,5mm de incisivos inferiores bovinos foram preparados em câmaras pulpares artificiais, divididos em quatro grupos: controle (G1); clareado com H_2O_2 a 35% com três aplicações de 15 minutos (G2); clareado com H_2O_2 a 35% com uma aplicação de 45 minutos (G3); e, clareado com H_2O_2 a 20% com uma aplicação de 45 minutos (G4), repetindo o processo três vezes com intervalo de uma semana. A cor foi avaliada (n=15) com espectrofotômetro antes, 24 horas após cada sessão e sete dias após o término do tratamento. A difusão do H_2O_2 (n=15) foi avaliada pela intensidade de violeta genciana pela reação com a enzima peroxidase, a densidade refletida foi aferida pelo espectrofotômetro, o metabolismo e morfologia celular através de metil-tetrazólio e microscopia eletrônica. Todos os protocolos clareadores obtiveram significativa alteração de cor. Apesar do G4 mostrar menor mudança de cor comparado ao G2 depois da última sessão, após 28 dias todos foram similares. A menor difusão foi encontrada no G4 em todas as sessões. Independente do método aplicado, encontraram redução significativa da viabilidade e da morfologia celular nos grupos clareados em relação ao controle. O decréscimo na viabilidade celular foi de 35,49% no G2, 37,10% no G3 e, 30% no G4.

Apesar da redução da difusão ocorrida nos protocolos com menores aplicações por sessão clínica (G3, G4) comparado ao protocolo padrão (G2), todas as técnicas foram citotóxicas as células tipo odontoblásticas.

Em comparação de dois protocolos de aplicação com H₂O₂ a 20% e 35% com e sem cálcio na fórmula, Mena-Serrano *et al.* (2015) avaliaram a quantidade difundida de peróxido através das estruturas dentais de 50 pré-molares inferiores humanos. Os grupos avaliados foram: H₂O₂ a 35% sem cálcio (n=10); H₂O₂ a 35% com cálcio (n=10); H₂O₂ a 20% sem cálcio (n=10); H₂O₂ a 20% com cálcio (n=10); e, grupo controle que não recebeu gel clareador. A quantidade de peróxido que penetrou nas câmaras foi mediada pela reação com violeta genciana catalisado por peroxidase, mensurada pelo espectrofotômetro. A espessura esmalte-dentina da face vestibular foi medida por radiografia, com média de 2,5±0,5mm. A quantidade de peróxido encontrada na câmara pulpar nos grupos clareados sem cálcio foi maior (3,469±1,014µg para H₂O₂ a 35% e 3,251±1,179µg para H₂O₂ a 20%) que nos grupos clareados com cálcio (0,640±0,554µg para H₂O₂ a 35% e 0,664±0,982µg para H₂O₂ a 20%). Isso pode ser explicado pelo alto pH das fórmulas com cálcio (9,0 e 9,2, respectivamente) comparados aos géis sem cálcio (6,5 e 6,6, respectivamente). O alto pH faz a rápida dissociação do peróxido diminuindo a quantidade ativa para penetração.

2.2 Ativação química

A ativação química do H₂O₂ é uma grande vantagem, pois não há aquecimento pulpar, reduzindo assim o potencial danoso do procedimento clareador de consultório. Visando avaliar diferentes métodos de ativação química do peróxido de hidrogênio a 35% sobre a mudança de cor e penetração através de esmalte e dentina, Torres *et al.* (2010) utilizaram discos de esmalte-dentina de 104 incisivos bovinos. Observaram-se redução da penetração do H₂O₂ quando adicionado gluconato de manganês e sulfato ferroso. Sugeriram que isso provavelmente pode diminuir os efeitos negativos do procedimento clareador no tecido pulpar. A adição

desses ativadores químicos aumentaram a eficácia do H₂O₂ em cerca de 1,5 a 8 vezes.

Em 2013, Torres *et al.*, em trabalho semelhante, avaliaram o efeito da concentração e ativação do gel clareador H₂O₂ no tempo de difusão através das estruturas dentais de 120 incisivos bovinos. Compararam fontes de ativação do gel clareador, fonte de luz e gluconato de manganês, em duas concentrações de H₂O₂ a 20% e 35%. O H₂O₂ a 35% difundiu-se através das estruturas dentais mais rapidamente que o H₂O₂ a 20%. Apesar do peróxido a 35% precisar de um menor período de tempo para chegar na câmara pulpar, o uso de luz como ativador não diminuiu o seu tempo de difusão, diferente do H₂O₂ a 20%. A baixa concentração do agente clareador é menos prejudicial, mas não impede a eficiência. O ativador químico gluconato de manganês aumentou o tempo de difusão do H₂O₂ a 20% através do esmalte e dentina.

2.3 Resposta pulpar

Dias Ribeiro *et al.* (2009) avaliaram a citotoxicidade do peróxido de hidrogênio a 35% ativado ou não por luz halógena em cultura de células após penetração em esmalte e dentina. Utilizaram 40 discos de esmalte-dentina de 3,5mm de incisivos bovinos em que a cultura de células tipo odontoblásticas MDPC-23 estavam em contato direto com a dentina. Foram divididos em quatro grupos de 10 espécimens cada: G1 clareado com H₂O₂ a 35%; G2 clareado com H₂O₂ a 35% ativado 20 segundos por luz halógena; G3 recebeu apenas luz halógena; e, G4 controle, não recebeu nenhum tratamento. Os grupos clareados receberam duas aplicações de 15 minutos. O metabolismo celular foi avaliado pela atividade da enzima succinil desidrogenase, já a morfologia celular foi avaliada por meio do microscópio eletrônico de varredura. Houve redução do metabolismo celular em 31,7% no primeiro grupo, 41,6% no segundo grupo e 11,5% para o terceiro grupo. Ocorreram alterações morfológicas significativas apenas nos grupos clareados, com redução do tamanho celular e dos prolongamentos citoplasmáticos.

Coldebella *et al.* (2009) avaliaram o efeito citotóxico do H₂O₂ a 35% com e sem luz halógena em cultura de células, após cinco consecutivas aplicações. Foram utilizados 15 discos de esmalte-dentina de 3,5mm de espessura de incisivos bovinos. Foram divididos em três grupo: G1 clareado com H₂O₂ a 35% por quinze minutos; G2 clareado com H₂O₂ a 35% acrescido de luz halógena por 20 segundos; e, G3 controle. O metabolismo celular foi avaliado pela atividade da enzima sucinil desidrogenase, já a morfologia celular foi avaliada por meio do microscópio eletrônico de varredura e a dosagem proteica realizada pelo teste ELISA. Houve uma redução do metabolismo celular de 62,09% e de 61,83% nos G1 e G2, respectivamente. A dosagem proteica também diminuiu 93,13% no G1 e 91,80% no G2. Os grupos clareados sofreram grandes alterações morfológicas, com redução do número de células e tamanho do citoplasma comparado ao grupo controle. Independente do uso ou não da luz halógena, os componentes do gel clareador foram capazes de causar efeitos citotóxicos a cultura de células tipo odontoblásticas.

Trindade *et al.* (2009) avaliaram a citotoxicidade, sobre cultura de células, do H₂O₂ a 35% após três consecutivas aplicações com ou sem aplicação de luz halógena. Foram utilizados 15 discos de esmalte-dentina de 3,5mm sobre cultura de células, dividas em três grupos: (G1) H₂O₂ a 35% três aplicações de 15 minutos; (G2) H₂O₂ a 35% três aplicações de 15 minutos e três de luz halógena por 20 segundos; (G3) grupo controle que não recebeu tratamento clareador. Foram avaliados a atividade metabólica pela atividade da enzima sucinil desidrogenase e a morfologia celular com auxílio do microscópio eletrônico de varredura. Houve redução do metabolismo celular de 92,03% no G1 e de 82,47% no G2, no entanto, a diferença não foi significativa entre os grupos clareados. O número de células remanescentes e a morfologia celular foram alterados nos grupos clareados comparados ao grupo controle. Ou seja, os produtos derivados da degradação do peróxido de hidrogênio causaram alterações citológicas graves comparados ao grupo controle.

Além da espessura, as características estruturais dos tecidos, como grau de mineralização, número e diâmetro dos túbulos dentinários podem influenciar na difusão do gel clareador através dos tecidos duros até a polpa e causar resposta inflamatória. Kina *et al.* (2010) avaliaram microscopicamente a resposta pulpar de 24 pré-molares humanos, quando aplicado H₂O₂ a 38%. Foram três grupos: clareado

acrescido de luz halógena (n=10); clareado apenas (n=10); e, grupo controle (n=4). Após o clareamento todos receberam aplicação de gel dessensibilizante na superfície clareada, por 5 minutos. De 2 a 15 dias após o tratamento clareador os dentes extraídos passaram ao preparo histológico. A avaliação histológica se deu através de três parâmetros: resposta inflamatória celular, desorganização celular pulpar e formação de dentina reacionária. Observaram que nos dentes clareados, mesmo no grupo que utilizou luz halógena nenhuma resposta pulpar inflamatória significativa foi encontrada. A aplicação da luz não foi mais agressiva que a aplicação do gel clareador, se houve alteração de temperatura ou aumento da difusão do H_2O_2 não foi significativamente danoso à polpa dos pré-molares.

Em análise histológica do efeito citotóxico do H_2O_2 , Costa *et al.* (2010) avaliaram e compararam a resposta pulpar de incisivos e pré-molares inferiores humanos submetidos a aplicação de H_2O_2 a 38%. Dezesesseis dentes jovens foram utilizados: pré-molares clareados, incisivos clareados, pré-molares não clareados, e incisivos não clareados como grupo controle. Houve uma diferença significativa na espessura da dentina, com os incisivos (1,83 mm) apresentando menor espessura que os pré-molares (3,1 mm). Os pacientes relataram dor pós clareamento nos incisivos. No grupo dos incisivos clareados três dos quatro apresentaram pontos de necrose, deposição de dentina reacional na polpa radicular, com moderada resposta inflamatória (células mononucleadas) e vasos dilatados e congestos. Sugeriu-se que a difusão dos componentes tóxicos do agente clareador através do esmalte e dentina em incisivos inferiores, é capaz de causar dano pulpar. Afirmam que a diferente resposta pulpar entre pré-molares e incisivos ocorreu devido a espessura dental, de tal forma que a espessura de esmalte e dentina desempenha papel importante na proteção do tecido pulpar ao agente clareador.

2.4 Mecanismos de proteção pulpar

A polpa possui mecanismos de proteção frente a substâncias que possam penetrar nas estruturas dentais. Devido ao seu baixo peso molecular, o H_2O_2 tem facilidade em penetrar as estruturas dentais. Bowles e Thompson (1986) avaliaram o

efeito do aquecimento e do H_2O_2 isolados e associados nas enzimas pulpares em diversos tempos e concentrações em uma temperatura de $50^\circ C$. Foram utilizados 80 dentes de bovinos conservados a uma temperatura de $4^\circ C$. A polpa foi retirada e separaram-se sete enzimas: fosfatase alcalina, aldolase, glicose 6 fosfato-desidrogenase, glutaminoxaloacético transaminase, isocitrato desidrogenase, malato desidrogenase e fosfohexose isomerase. As análises foram realizadas com H_2O_2 de 2,5%, 7,5% e 15% a 50° por 7,5, 15 e 30 minutos, respectivamente. As enzimas foram escolhidas por sua estabilidade e porque elas estão envolvidas em todo metabolismo de carboidratos, lipídeos e aminoácidos da polpa ou no processo de mineralização. Como resultados, encontraram que somente o aquecimento a $50^\circ C$ teve pequeno efeito sobre as enzimas pulpares com exceção da glicose 6 fosfato-desidrogenase. As enzimas isocitrato desidrogenase e glicose 6 fosfato-desidrogenase sofreram severamente a todas concentrações de H_2O_2 maiores que 5%. As enzimas como a glutaminoxaloacético transaminase, a fosfohexose isomerase e adolase foram relativamente resistentes aos tratamentos isolados, calor ou H_2O_2 , porém quando expostas ao tratamento combinado (aquecimento e H_2O_2) foram severamente afetadas. Nos dentes há a limitação dos mecanismos de proteção frente a pressão hidrodinâmica causada pela injúria tecidual, quebra do metabolismo ou dano a membrana biológica. Isso pode levar a resposta inflamatória e, conseqüentemente, a necrose pulpar e tratamento endodôntico. O estudo sugeriu que a associação H_2O_2 e calor potencializa os efeitos no tecido pulpar. Então, o dano pulpar em dentes clareados pode ser causado pela inativação enzimática e conseqüente disfunção das atividades celulares normais.

Um possível mecanismo de proteção pulpar ao H_2O_2 é pelo processo de quebra enzimática pela catalase, que o transforma em água e oxigênio, e a peroxidase, que utiliza o H_2O_2 para oxidação de algum outro substrato. Bowles e Burns (1992) avaliaram a capacidade de tecido pulpar de terceiros molares humanos em degradar por meio de enzimas o H_2O_2 a 30%, sendo a polpa a fonte dessas enzimas. As polpas dos dentes extraídos foram diluídas em soluções de sódio para extração das enzimas catalase e peroxidase. Avaliaram a atividade enzimática construindo uma curva dose-tempo dependente. Como em polpa de dentes extraídos há pouco nível sérum, pouca atividade enzimática foi influenciada pela peroxidase neutrofílica ou eosinofílica. Na inflamação o aumentado fluxo sanguíneo

pode contribuir para aumentar peroxidase. Os tecidos duros impedem o inchaço do tecido pulpar frente ao processo de inflamação e hiperemia, fazendo aumentar a pressão hidrostática e a odontalgia. A baixa atividade da catalase e a falta de atividade da peroxidase alertam para se ter cautela no uso de agentes clareadores.

Anderson *et al.* (1999) avaliaram a presença de hemeoxigenase-1 no tecido pulpar após clareamento com peróxido de carbamida a 10%. Utilizaram para pesquisas pacientes com pré-molares indicados para exodontia, sendo 17 dentes clareados durante 4 horas imediatamente antes da extração e, 14 dentes não clareados. Após extraídos, os dentes passaram por uma análise imunohistológica para avaliar a presença de hemeoxigenase-1 nas células pulpares. Observaram que os odontoblastos e células mesenquimais subjacentes à superfície clareada produziram a hemeoxigenase-1, indicando uma reação a nível molecular contra o estresse oxidativo causado pelo peróxido de hidrogênio. Porém, os dados não foram estatisticamente significantes quando comparados ao grupo controle, isso pode explicar porque histologicamente não se encontrou inflamação pulpar.

Os odontoblastos e a matrix dentinária quando lesados ou removidos para serem formados precisam passar por dois processos: diferenciação de células pulpares em odontoblastos secundários e a secreção de dentina reparadora. Uma das maneiras de observar a produção de dentina pelos odontoblastos é por meio da fosfatase alcalina. Lee *et al.* (2006) avaliaram o efeito citotóxico do H_2O_2 na diferenciação celular dos odontoblastos e em pré-odontoblastos, medindo a fosfatase alcalina. Ambas culturas sofreram severa morte celular após altas concentrações de H_2O_2 por 1, 4 ou 15 dias. Houve uma significativa queda na atividade da fosfatase alcalina nas células pré-odontoblásticas quando submetidas a H_2O_2 (0,2 ou 0,3 mmol/L) por quatro dias comparado com o grupo controle. Do contrário, houve um aumento da fosfatase alcalina, ou seja, induziu-se diferenciação na cultura de odontoblastos quando expostos a 0,1 e 0,2 mmol/L de H_2O_2 pelo mesmo período de tempo. Além disso, após 14 dias, observaram um significativo aumento de mineralização de matriz extracelular, na presença de 0,2 e 0,3 mmol/L de H_2O_2 , comparado com o grupo controle. A fosfatase alcalina é um marcador de diferenciação celular imediato, enquanto que a mineralização é um marcador tardio de diferenciação. Os resultados sugeriram um efeito favorável do H_2O_2 na cultura de odontoblastos por induzir a diferenciação celular e a formação de dentina, porém, é um estudo *in vitro* sendo necessária pesquisa *in vivo* para confirmar os resultados.

A sialoproteinase é um marcador biológico de odontoblastos com papel na mineralização da dentina reacional. Enquanto a heme oxigenase-1 é um mecanismo proteico contra o H_2O_2 . Min *et al.* (2008) avaliaram a influência de diferentes concentrações do H_2O_2 na heme oxigenase-1 e em um dos mediadores de diferenciação celular em células pulpares humanas, a sialoproteinase. Observaram redução na viabilidade pulpar, pela atividade da succinil desidrogenase, e esta foi dependente do tempo e da concentração do H_2O_2 . Além disso, houve indução de heme oxigenase-1 nas células pulpares sendo associado à citoproteção celular. As células expostas 24 horas ao H_2O_2 demonstraram expressão de sialoproteinase, avaliada pela resposta da cadeia de transcriptase-reversa, sugerindo que a presença de baixas doses de H_2O_2 pode facilitar a diferenciação celular dos odontoblastos e a formação de dentina primária no tecido pulpar.

Outro mecanismo de proteção pulpar é a liberação da substância P, que é um neuropeptídeo responsável por induzir a vasodilatação na região pulpar aumentando o fluxo sanguíneo permitindo a chegada de células inflamatórias e a liberação de mediadores inflamatórios. Um estudo descritivo comparativo, Caviedes-Bucheli *et al.* (2008) avaliaram a expressão da substância P após o clareamento dental com H_2O_2 em diferentes concentrações em pré-molares. Foram 40 dentes divididos em quatro grupos: controle; H_2O_2 a 38% por 15 minutos; H_2O_2 a 35% ativado por laser diodo por 3 minutos e, H_2O_2 a 25% com ativação por luz por 20 minutos. Os dentes foram extraídos e a polpa foi removida e passou pelo radioimunoensaio para avaliar a quantidade de substância P. Os autores sugerem que a exposição do tecido pulpar a substância P pode indiretamente levar a hiperalgesia. Encontraram maior liberação da substância P no grupo em que se utilizou H_2O_2 a 25% com ativação por luz ($1649,52 \pm 341,97$ pmolSP/mg) e no grupo laser e H_2O_2 a 35% ($1054,66 \pm 155,55$ pmolSP/mg) mostrando que não somente a concentração do agente clareador, mas principalmente, o uso de ativadores (fonte de luz e calor) aumentaram a liberação de substância P. Os altos níveis de liberação de substância P são relevantes clinicamente, pois podem desenvolver uma reação pulpar inflamatória neurogênica (dor severa ou espontânea).

2.5 Mudanças de protocolos

Buscando avaliar diferentes técnicas em relação a eficácia e a produção de sensibilidade no clareamento em estudo randomizado, Dawson *et al.* (2011) avaliaram: clareamento caseiro com peróxido de carbamida a 16%; clareamento caseiro com peróxido de carbamida a 16% associado ao clareamento supervisionado com H₂O₂ a 9%; e, clareamento caseiro com peróxido de carbamida a 16% associado ao supervisionado com H₂O₂ a 27%. O uso combinado do clareamento caseiro e o supervisionado teve considerável mudança de cor somente imediatamente ao fim do clareamento. Uma semana depois o resultado foi o mesmo em ambas as técnicas tanto para a mudança de cor quanto para a sensibilidade, não tendo diferença estatística significativa.

Reis *et al.* (2011) avaliaram a eficácia e a sensibilidade dental causada pelo uso do H₂O₂ a 35% em três aplicações de 15 minutos e uma aplicação de 45 minutos. Foram selecionados 30 pacientes que foram divididos em dois grupos de acordo com as aplicações. A eficácia do clareamento foi avaliada por meio da escala Vita e a sensibilidade dental por escore. A mudança de cor, depois de duas semanas, ocorreu mais rapidamente após as sessões de clareamento no grupo de três aplicações (6,9 unidades da escala) comparado ao grupo clareado com uma aplicação por sessão (5,8 unidades). Em relação a sensibilidade, 46,7% dos participantes do segundo grupo reportaram sensibilidade moderada comparado a 26,7% do grupo clareado pelo protocolo padrão.

Kossatz *et al.* (2012) avaliaram a eficácia e a sensibilidade no uso do peróxido de hidrogênio a 35% com e sem 2% de gluconato de cálcio. Participaram 40 pessoas que foram divididas nos dois grupos: H₂O₂ a 35% (três aplicações de 15 minutos); e, H₂O₂ a 35% com cálcio (uma aplicação de 40 minutos). A cor foi avaliada inicialmente e um dia após cada sessão por meio da escala Vita seguindo o guia da ADA (Associação Dental Americana), e a sensibilidade foi avaliada por meio de escore. No grupo clareado com H₂O₂ a 35% com cálcio, 60% não apresentaram sensibilidade e, além de apresentar menor risco absoluto à sensibilidade, também apresentou menor intensidade. Apesar do cálcio no clareador ser adicionado apenas para prevenir a desmineralização do esmalte, os autores não descartam a

possibilidade dessa adição ter minimizado a sensibilidade dental. Isso pode ser explicado pelo cálcio diminuir a permeabilidade dentinária, bloquear os defeitos do esmalte e maior pH da solução clareadora.

Em vista que, uma interessante alternativa para minimizar o dano oxidativo às células pulpares é reduzir a difusão do H_2O_2 do tratamento clareador, Soares *et al.* (2014) estudaram a concentração e períodos de aplicação na difusão do peróxido, avaliando a viabilidade de células pulpares, bem como a eficácia do tratamento. Realizaram diferentes períodos de aplicação (três aplicações de 15 minutos, uma aplicação de 15 minutos, e uma aplicação de cinco minutos) com duas concentrações de H_2O_2 a 35% e 17,5%, sendo dois tempos de avaliação (imediatamente após a aplicação e 72 horas depois). Utilizaram culturas de células e observaram redução da viabilidade e alteração da morfologia celular diretamente proporcional ao tempo de aplicação e concentração do gel clareador. A maior viabilidade celular nos dois tempos de avaliação ocorreu no grupo com uma aplicação 5 minutos de H_2O_2 a 17,5% sendo de 34,9% para avaliação imediatamente após o clareamento e de 92,7% após 72 horas do procedimento clareador. Na terapia convencional houve redução de 54,5% da viabilidade celular. A redução do tempo de aplicação para 15 minutos reduziu significativamente a difusão do H_2O_2 , diminuindo a toxicidade à cultura de células comparada à técnica tradicional. No entanto, a mudança de cor foi significante maior, em ambas as sessões, para o grupo com a técnica 3x15min comparado aos demais grupos experimentais.

Visando minimizar o tempo do tratamento clareador, Paula *et al.* (2015) avaliaram a intensidade e o risco do clareamento induzir sensibilidade dental em sessões com intervalo de dois dias comparado ao padrão de sete dias. Foram selecionados 40 pacientes, clareados na arcada superior em duas sessões de 40 minutos com H_2O_2 a 35% com cálcio, em dois grupos com intervalos de dois e sete dias. A cor foi avaliada pela escala Vita e por meio de espectrofotômetro, antes e após 30 dias do clareamento. A sensibilidade dental foi mensurada por meio de escala visual analógica durante, 1 hora, 24 horas, 48 horas e 30 dias após o clareamento. Não observaram diferenças entre os grupos em relação ao risco de desenvolver sensibilidade. Os relatos de sensibilidade foram maiores nas primeiras 24 horas não havendo dor após 30 dias. A eficiência do clareamento foi similar em

ambos os grupos, mostrando-se efetivos com alteração de seis graus na escala de cor.

3 OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Avaliar o efeito do gel clareador a base de H_2O_2 a 20% em polpa humana.

3.2. Objetivos específicos

Analisar a resposta inflamatória celular frente à aplicação de gel clareador a base de H_2O_2 a 20% em dentes incisivos inferiores humanos.

Analisar a desorganização do tecido pulpar quando aplicado H_2O_2 a 20% em dentes incisivos inferiores humanos.

Mensurar a espessura de esmalte-dentina dos incisivos inferiores humanos.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Delineamento do estudo

Estudo clínico, com níveis de aplicação de prevenção secundária, randomizado, cego, do tipo boca dividida.

4.2 Seleção da amostra

A pesquisa foi realizada com pacientes, de ambos os sexos e com idade entre 38 e 60 anos, com, no mínimo, dois dentes incisivos inferiores indicados para extração por motivos periodontais e/ou protéticos. Como critérios de inclusão foram selecionados dentes hígidos, sem a presença de trincas ou de defeitos no esmalte e com diagnóstico de vitalidade pulpar prévio (exame térmico frio e radiográfico). Os critérios de exclusão foram dentes com trauma oclusal, com processo degenerativo da polpa (obliteração por cálculo pulpar, calcificação radicular) e pacientes que ingeriram anti-inflamatório até 30 dias antes do clareamento.

A amostra foi composta por três pacientes que compareceram na clínica odontológica, da Faculdade Professor Albino Coimbra Filho, e concordaram, voluntariamente, com o termo de consentimento livre e esclarecido. O mesmo, previamente, submetido e analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Humanos da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul aprovado pelo número 32447114.4.0000.0021.

4.3 Procedimento clareador

Entre os dois dentes selecionados, foi escolhido aleatoriamente, por meio de sorteio (papel), qual era do grupo controle (GC) e do grupo experimental, no qual foi aplicado o gel clareador (GE), ambos com quatro dentes em cada grupo (Tabela 1).

Tabela 1- Distribuição da amostra (n) e grupos de participantes

Grupo	Tratamento	N
GE	Incisivos experimental	4
GC	Incisivos controle	4

Os dentes foram limpos com taça de borracha e pedra pomes, completamente lavados e secos com jato de ar livre de óleo. Em seguida, confeccionada uma barreira gengival, fotoativada (Top Dam da FGM Produtos Odontológicos Ltda, Joinvile, SC, Brasil) para proteger os tecidos moles e os dentes adjacentes.

Seguindo as recomendações do fabricante o H₂O₂ a 20% (Whiteness HP 20% da FGM Produtos Odontológicos Ltda, Joinvile, SC, Brasil) (Figura 1) foi utilizado com aplicação única por sessão, com duração de 50 minutos, na superfície vestibular dos dentes. A camada continha entre 0,5 a 1 milímetro de espessura do gel. Em seguida, o agente foi aspirado por uma cânula de endodontia e os dentes lavados com água em abundância. O protetor gengival foi removido e em seguida realizado o polimento da superfície com pasta de polimento (Diamond da FGM Produtos Odontológicos Ltda, Joinvile, SC, Brasil) e discos de feltro. Foram no total três aplicações, com intervalo entre as sessões de uma semana.



Figura 1 - Whiteness HP 20% da FGM Produtos Odontológicos Ltda, Joinvile, PR, Brasil.
Fonte: www.fgm.ind.br.

4.4 Procedimento cirúrgico

Dois dias após o final do tratamento clareador, os dentes foram extraídos, sob efeito de anestesia local (Cloridrato de Mepivacaína a 2 % com Adrenalina 1:100.000, Dentsply, Catanduva, SP, Brasil), por meio da técnica de bloqueio do nervo incisivo, que é um ramo terminal do nervo alveolar inferior. Através de uma agulha curta de calibre 25 introduzida na prega mucovestibular no forame mentoniano, tendo como ponto de referência os pré-molares inferiores com orientação do bisel voltado para o osso durante a injeção, no nível do canino cerca de 5 a 6 mm, injetando o anestésico lentamente. Devido o tecido mole lingual não ser anestesiado por essa técnica houve necessidade de injetar anestésico diretamente sobre a região.

Com auxílio de um sindesmótomo, as fibras gengivais e crestodentais foram cuidadosamente desinseridas com movimentos de lateralidade em todo o contorno do dente. O fórceps 151 foi utilizado para preensão do dente na região do colo e por meio de movimento de lateralidade e expulsão os dentes foram extraídos. Os alvéolos foram irrigados com soro fisiológico e curetados e o tecido suturado. Todos os pacientes foram devidamente orientados e medicados com analgésico (Dipirona Sódica 500mg) para evitar dor pós-cirúrgica.

As raízes foram seccionadas em seu terço médio, entre a junção amelo-cementária e o ápice, com disco dupla-face diamantado (KG Sorensen Indústria e Comércio Ltda, São Paulo, SP, Brasil) em peça-de-mão. Este corte se deve ao fato da análise ser realizada apenas na polpa coronária e não na radicular.

4.5 Preparo dos dentes

Para obter a espessura esmalte-dentina os dentes foram radiografados por um aparelho de raio X (Dabi Atlante modelo Spectro® 70 X, Classe I, tipo B, corrente 8 mA, voltagem tubo 70 KVp, com número de série 000146), sobre um sensor digital número 2 (Kodak RVG 5100, Rochester, Nova Iorque, EUA). O feixe incidiu perpendicularmente à película radiográfica, e o dente posicionado de tal forma que a

superfície mesial permaneceu voltada para cima. A imagem foi analisada por aparelho digital (Digora® fmx software 2.5, Soredex Orion Corporation, Helsink, Finlândia), que possui uma ferramenta que torna capaz medir em milímetros a espessura do esmalte e dentina (Figura 2). Foi feita a aferição partindo da superfície vestibular até a câmara pulpar dos dentes, tendo como região de avaliação o terço médio de cada dente. Para cada dente foram tomadas três medidas de espessura e a média dessas foi considerada a espessura do dente avaliado.

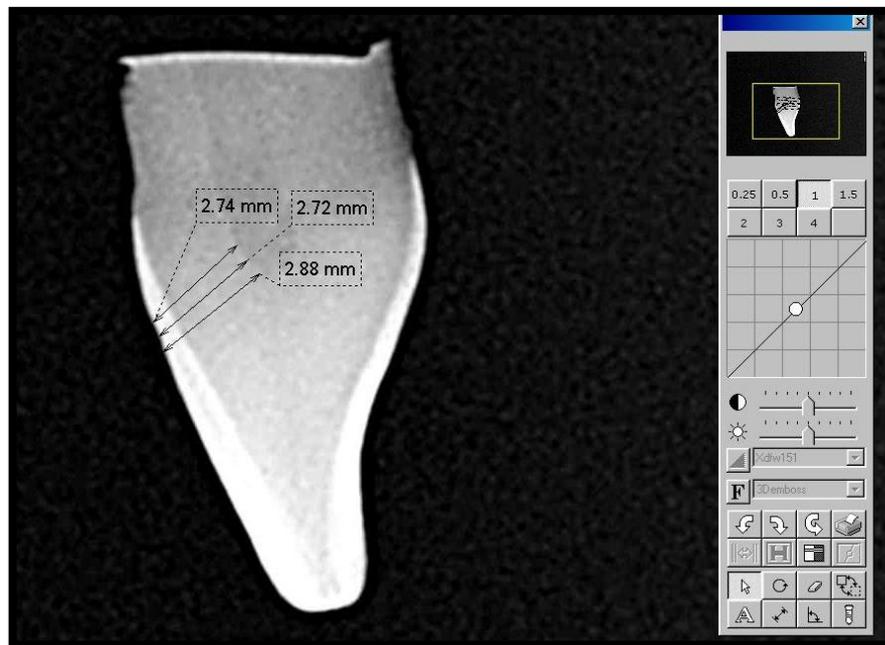


Figura 2 – Imagem da radiografia digital com a amostra em posição, com a face mesial voltada para a incidência do feixe radiográfico. Barra de trabalho do programa Digora® fmx software 2.5, com as três medidas de esmalte-dentina no terço médio da face vestibular.

4.6 Processamento histológico dos dentes

Imediatamente após a tomada radiográfica, os dentes foram armazenados em solução fixadora de formalina por 48 horas pH 7,2, descalcificados em solução de EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) sob agitação com troca a cada quatro dias, terminando o processo de descalcificação após 60 dias do início. Limpos em

álcool durante 20 minutos cada a 80%, duas vezes no álcool a 95%, duas no álcool a 100%, esse processo gradativo para desidratar o tecido para receber o xilol, sendo duas trocas de 20 minutos cada, este é um solvente da parafina. Passou-se a inclusão com cera de parafina à vácuo e finalmente embebido em parafina. Foram confeccionados secções de 4 micrometros (μm) de espessura, montados em lâminas de vidro, armazenados na estufa por 30 minutos e corados com hematoxilina e eosina (HE).

As lâminas foram avaliadas por três avaliadores calibrados, com auxílio de microscópio de luz e microssistema Leica DM5500B (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). Escores foram atribuídos para analisar a resposta inflamatória e a desorganização do tecido pulpar. As amostras foram categorizadas de acordo com as Tabelas 2 e 3, respectivamente (KINA *et al.*, 2010). Inicialmente foi feita a leitura do dente controle e a partir dessa leitura, toda alteração encontrada no dente clareado recebeu um escore de resposta celular e desorganização pulpar.

Tabela 2- Escore atribuído à resposta celular inflamatória.

Escore	Caracterização
0	Nenhum ou pouco infiltrado de células inflamatórias localizado na polpa coronal, característico de um tecido normal.
1	Leve infiltrado com leucócitos polimorfonucleares ou mononucleares.
2	Moderado infiltrado de células inflamatórias envolvendo a polpa coronal.
3	Severa infiltração inflamatória envolvendo a polpa coronal ou caracterizando abscesso.

Tabela 3- Escore atribuído à desorganização tecidual pulpar.

Escore	Caracterização
0	Tecido normal.
1	Camada de odontoblastos desorganizada, mas polpa normal na parte central da polpa coronária.
2	Total desorganização da morfologia pulpar.
3	Necrose pulpar.

4.7 Análise dos dados

Os dados foram tabulados em Microsoft Excel 2010 e para a análise estatística foi utilizado o software BioEstat 5.0. Foi realizado o teste estatístico Mann-Whitney com nível de significância de 5% para ambas as situações, infiltrado inflamatório e desorganização tecidual pulpar.

5 RESULTADOS

Os escores, determinados pela análise histológica, atribuídos para os critérios resposta celular inflamatória e desorganização tecidual pulpar das amostras de acordo com os grupos encontra-se disposto na Tabela 4.

Tabela 4 – Frequência absoluta (n) observada em ambos os eventos histopatológicos de acordo com os grupos, categorizada por escore

Evento histopatológico	Grupo	Escore			
		0	1	2	3
Resposta celular inflamatória	GE	2	1	1	0
	GC	4	0	0	0
Desorganização tecidual pulpar	GE	1	2	1	0
	GC	4	0	0	0

GE= grupo incisivos clareados (n=4); GC= grupo incisivos controles (n=4).

Em relação à presença de infiltrado inflamatório foi observada diferença significativa entre os grupos $p=0,0028$ (Tabela 5), onde o grupo clareado apresentou maior quantidade de células inflamatórias conforme apresentado na Figura 3.

Tabela 5 – Escores mínimos, máximos e mediana do grupo controle e clareado em relação a resposta celular inflamatória

Resposta celular inflamatória	Mínimo	Máximo	Mediana
Grupo experimental	0	2	1 ^a
Grupo controle	0	0	0 ^b

Letras diferentes na vertical representam diferença estatística ($p<0,05$).

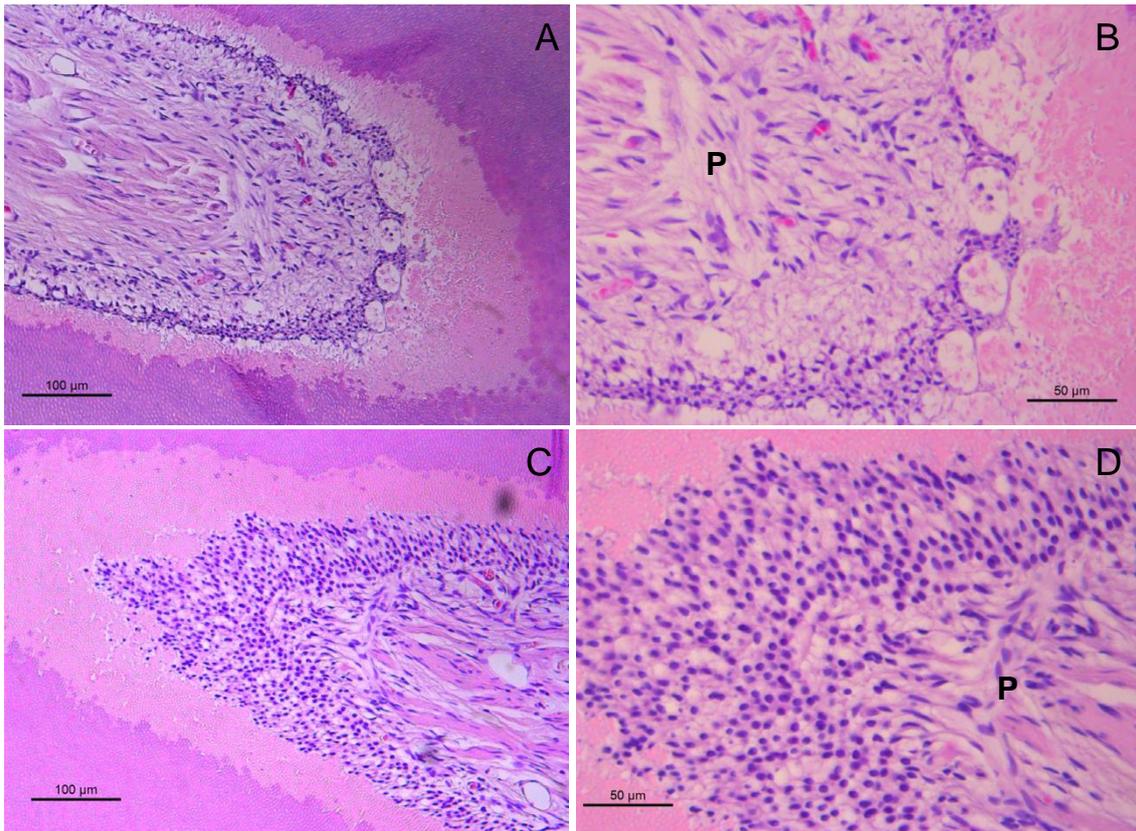


Figura 3 - **A**, incisivo inferior grupo controle. HE, X20. **B**, P polpa central grupo controle. HE, X40. **C**, incisivo inferior grupo clareado do mesmo paciente, tecido pulpar com moderada quantidade de infiltrado inflamatório (leucócitos mononucleares) comparado ao grupo controle. HE, X20. **D**, clareado em maior aumento com a camada de odontoblastos, a zona livre de células e a zona rica em células com grande quantidade de linfócitos, somente a polpa central (P) não possui infiltrado. HE, X40. (Leica DM5500B)

Quanto à desorganização pulpar houve diferença estatisticamente significativa entre o grupo clareado e o controle ($p < 0,0001$) (Tabela 6), com lâmina do grupo clareado apresentando total desorganização da morfologia celular, não podendo ser observado a delimitação entre as camadas da polpa (Figura 4).

Tabela 6 – Escores mínimos, máximos e mediana do grupo controle e clareado em relação a desorganização tecidual pulpar

Desorganização tecidual pulpar	Mínimo	Máximo	Mediana
Grupo experimental	0	2	1 ^a
Grupo controle	0	0	0 ^b

Letras diferentes na vertical representam diferença estatística $p < 0,001$.

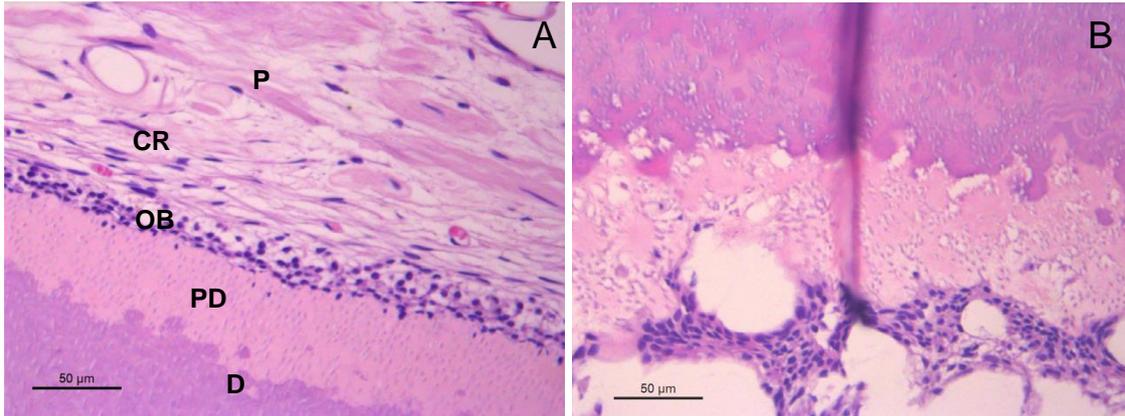


Figura 4 – **A**, incisivo pertencente a grupo controle, D, dentina; PD, pré-dentina; OB, camada de odontoblastos; CR, zona rica em células; P, polpa central. HE, X40. **B**, incisivo clareado do mesmo paciente, grande desorganização da camada odontoblástica, leve infiltrado inflamatório crônico, e total desorganização da morfologia pulpar. HE, X40. (Leica DM5500B)

O valor da espessura, em milímetros, de esmalte-dentina encontrado para cada incisivo estudado, aferida pelo Digora® fmx software 2.5, pode ser observado na Tabela 7. Os valores encontrados variam de 2,84 a 2,03mm com média de (2,44± 0,4mm).

Tabela 7 – Espessura esmalte e dentina do terço médio da face vestibular, escore segundo resposta celular inflamatória e desorganização tecidual pulpar e o tratamento aplicado na amostra

Dente	Média espessura esmalte dentina (mm)	Resposta celular inflamatória (escore)	Desorganização pulpar (escore)	Tratamento aplicado
1	2,84	2	1	Clareado
2	2,65	0	0	Controle
3	2,12	0	1	Clareado
4	2,79	0	0	Controle
5	2,79	0	0	Controle
6	2,03	0	0	Controle
7	2,16	1	2	Clareado
8	2,21	0	0	Clareado

6 DISCUSSÃO

O agente clareador deve ter a capacidade de penetrar através das estruturas dentais para a decomposição das moléculas cromóforas e, assim deixar os dentes mais claros. A quebra das moléculas em partes menores permite um aspecto opticamente claro ao dente (DAHL; PALLESEN, 2003). O peróxido de hidrogênio possui a capacidade de difundir através das estruturas dentais (HANKS *et al.*, 1993; BENETTI *et al.*, 2004; KINA *et al.*, 2010, HANNING *et al.*, 2011; MENA-SERRANO *et al.*, 2015), em menos de dez minutos já é possível encontrar componentes da decomposição do agente clareador na interface dentina-polpa (UBALDINI *et al.*, 2013). A difusão se dá através dos espaços interprismáticos do esmalte (KWON *et al.*, 2012) e por uma atração pelos componentes orgânicos da dentina (UBALDINI *et al.*, 2013), há uma deposição do peróxido sobre a polpa (HANKS *et al.*, 1993; BENETTI *et al.*, 2004; LEE *et al.*, 2006; CAMARGO *et al.*, 2007; CARRASCO; COSTA *et al.*, 2010). A presença de materiais restauradores também aumenta a velocidade de difusão intradental do H₂O₂ (BENETTI, *et al.*, 2004; CAMARGO *et al.*, 2007), por esse motivo neste trabalho um dos critérios de inclusão foi dentes que estivessem hígidos e sem defeitos do esmalte.

O fluxo de difusão depende da concentração do agente clareador, do tempo e da superfície exposta (BENETTI *et al.*, 2004). Diversos trabalhos comparam o efeito do peróxido de hidrogênio a 35% com a 20% (TORRES *et al.*, 2013; MENA-SERRANO *et al.*, 2015; ALMEIDA *et al.*, 2015). Quanto maior a concentração do agente clareador, mais rapidamente se difunde pelos tecidos dentais (87,8±26,23min a 35% e 121,0±37,45min a 20%) (TORRES *et al.*, 2013). Além disso, a quantidade de H₂O₂ difundido também é menor quando se utiliza um produto a 20% sem que isso interfira no resultado estético ao final de 28 dias (ALMEIDA *et al.*, 2015). Devido à difusão do H₂O₂ ser dose dependente, optou-se por utilizar o gel clareador com menor concentração de H₂O₂, 20%, para realização desta pesquisa, visando desta forma conseguir resultados menos agressivos à polpa.

Agentes oxidantes na interface dentina-polpa ativa mecanismos de proteção pulpar, como catalase e peroxidase (BOWLES;BRUNS, 1992), produção de hemeoxigenase-1, como indicador de estresse oxidativo do peróxido de hidrogênio

(ANDERSON *et al.*, 1999), além de promover diferenciação celular em odontoblastos secundários e secreção de dentina reparadora (LEE *et al.*, 2006). Neste presente trabalho observou em algumas lâminas do grupo clareado a formação de dentina reparadora, resposta a agressão causada pelo H₂O₂.

Outro mecanismo de proteção é a ativação da substância P que é um neuropeptídeo indutor da vasodilatação dos vasos sanguíneos que permitem a entrada de células inflamatórias e mediadores da inflamação (CAVIEDES-BUCHELI *et al.*, 2008). Esse processo de vasodilatação causa compressão de terminações nervosas que pode levar a odontalgia. Apesar de não ser o objetivo da pesquisa, todos os pacientes relataram sensibilidade pós-operatória nos incisivos clareados sem, contudo, ter qualquer parâmetro de avaliação.

Na literatura diversos trabalhos alertam sobre os efeitos colaterais do tratamento clareador. A sensibilidade é o mais comum, sendo encontrado na maioria dos pacientes que se submetem ao tratamento clareador. Diversos trabalhos visam minimizar os efeitos adversos do clareamento dental (DAWSON *et al.*, 2011; TORRES *et al.*, 2013; MARSON *et al.*, 2015) seguindo a teoria de que acelerando a degradação do H₂O₂ em radicais livres diminuiria o tempo de contato do agente clareador com a superfície dental. Dentre os métodos de aceleração está a aplicação de calor ou fonte de luz (KINA *et al.*, 2010) sobre o gel clareador, o aumento do pH da solução clareadora (MENA-SERRANO *et al.*, 2015), adição de sais metálicos (KOSSATZ *et al.*, 2012) e extrato de raiz de amora no agente clareador (TORRES *et al.*, 2013).

Outra possibilidade para reduzir os efeitos colaterais do H₂O₂ é diminuir sua penetração pelas estruturas dentais, que pode ser alcançada com a utilização de agentes clareadores que apresentam maior pH (KOSSATZ *et al.*, 2012); adicionando gluconato de manganês e sulfato ferroso (TORRES *et al.*, 2010), ou mesmo uso de agentes que tenham em sua fórmula cálcio (MENA-SERRANO *et al.*, 2015). Por isso, na presente pesquisa foi utilizado um agente clareador que contém cálcio em sua formulação com intuito de diminuir a permeabilidade do H₂O₂, além de apresentar maior pH (9,2) que aumenta a dissolução do produto. Histologicamente, as lâminas apresentaram de leve a moderada presença de infiltrados inflamatórios, indicando que de qualquer forma houve difusão através do esmalte e dentina capaz de causar dano pulpar.

Os efeitos citotóxicos do H₂O₂ são relatados em diversos trabalhos. Dias Ribeiro *et al.* (2009), Coldebella *et al.* (2009); Trindade *et al.* (2009) avaliaram *in vitro* o efeito do H₂O₂ a 35% em cultura de células tipo odontoblásticas MDPC-23, todos encontraram alterações significativas no metabolismo, na quantidade e na morfologia celular após a aplicação do peróxido. Foram utilizadas discos de esmalte-dentina de incisivos bovinos de 3,5 mm, essa espessura é padronizada entre os trabalhos com a justificativa de que seria semelhante aos dentes humanos. No entanto, encontramos uma espessura menor de esmalte-dentina para os incisivos inferiores (2,44±0,4 mm). Ou seja, em incisivos humanos por apresentar espessura de esmalte-dentina menor, a difusão, conseqüentemente, é maior quando comparado com estudos *in vitro*. Nesse contexto, o atual trabalho tem grande valia, pois além de vários mecanismos pulpares não serem simulados no estudo *in vitro*, como pressão intrapulpar, fluxo do fluído dentinário (MICHIDA *et al.*, 2009), atividade enzimática (BOWLES; BURNS, 1992), para correta comparação, deve-se considerar sempre a espessura do dente a ser analisado.

Poucos trabalhos utilizam a técnica da boca dividida (BERNARDON *et al.*, 2010) onde o mesmo paciente integra o grupo controle e teste. No presente estudo a técnica *Split-mouth* foi utilizada visando diminuir alguns vieses. Em amostras que são de pacientes diferentes os fatores orgânicos não são completamente correlacionados. Nesta técnica, toda alteração pulpar que houve em relação ao incisivo controle foi causada pelo agente clareador.

Além da espessura, as características estruturais dos tecidos, como grau de mineralização, número e diâmetro dos túbulos dentinários podem influenciar na difusão do gel clareador através dos tecidos duros até a polpa (KINA *et al.*, 2010) e causar resposta inflamatória (COSTA *et al.*, 2010). Na resposta inflamatória aguda, que é abrupta e de curta duração (2-3 dias), há reação vascular com dilatação das arteríolas que permitem a chegada de mediadores químicos e células inflamatórias (HARGREAVES *et al.*, 2009). No presente estudo, o infiltrado inflamatório encontrado nas lâminas do grupo clareado possuem características de uma inflamação crônica. A deposição persistente de produtos do metabolismo, como do peróxido de hidrogênio, provocam esse tipo de resposta crônica (HARGREAVES *et al.*, 2009).

Numa resposta inflamatória crônica, diferente da aguda, pode-se observar maior número de linfócitos e macrófagos, além da ausência de vasos congestos

(HARGREAVES *et al.*, 2009). A presente pesquisa durou três semanas e, provavelmente, foi a razão para os achados histopatológicos assemelharem-se com o processo crônico. Os escores para resposta celular inflamatória foi de leve a moderada, com grande quantidade de linfócitos. Não foram encontrados neutrófilos, característico de quadros agudos, na polpa dentária dos incisivos.

Na literatura há trabalhos que avaliaram o efeito citotóxico apenas do H₂O₂ a 38% em polpa de dentes humanos *in vivo*. A utilização de H₂O₂ a 38%, com ou sem fonte de luz não promove qualquer alteração na resposta pulpar inflamatória quando o foco do estudo são dentes pré-molares humanos (KINA *et al.*, 2010). Porém, quando se compara a espessura da dentina e a resposta pulpar em incisivos e pré-molares inferiores, utilizando o mesmo agente clareador, os resultados são diferentes. Enquanto em pré-molares não são relatadas alterações significativas, em incisivos, nesses casos, podem ser observados pontos de necrose, com moderada resposta inflamatória e vasos dilatados e congestos. Diferentemente do presente estudo, os autores não utilizaram a técnica da boca dividida, apenas avaliaram a espessura de dentina e utilizaram maior concentração do H₂O₂. Os dados atuais demonstram que o H₂O₂ a 20% causou alterações pulpares significativas comparado ao grupo controle porém menos agressivas comparados aos achados histológicos de Costa *et al.* (2010). Em relação à desorganização tecidual pulpar houve escore com total desorganização da morfologia pulpar, entretanto como foi utilizado um agente com menor concentração a resposta, conseqüentemente, foi menor.

Dentro das limitações deste estudo indica-se a necessidade de novas pesquisas para estimular mudanças de protocolo clínico. Pois o H₂O₂ a 20% mesmo sendo em menor concentração que o uso padrão (H₂O₂ a 35%), causou alterações pulpares que são de interesse e relevância clínicos. Alguns autores já alertam e pesquisas apontam para novos protocolos com redução do tempo de aplicação e concentração do H₂O₂ (DAWSON *et al.*, 2011; REIS *et al.*, 2011; KOSSATZ *et al.*, 2012; SOARES *et al.*, 2014; PAULA *et al.*, 2015). Além disso, há a necessidade de se estabelecer protocolos clínicos de clareamento dental mais individualista, levando-se em conta a espessura do dente a ser clareado.

7 CONCLUSÃO

Baseado na metodologia usada no estudo, o peróxido de hidrogênio a 20% em incisivos inferiores humanos foi capaz de promover alterações pulpares significativas com características de inflamação crônica e desorganização tecidual pulpar. Os dentes estudados apresentaram espessura esmalte-dentina em média de $2,44 \pm 0,4$ mm.

REFERÊNCIAS

Almeida LCAG, Soares DG, Gallinari MO, Costa CAS, Santos PH, Briso ALF. Color alteration, hydrogen peroxide diffusion, and cytotoxicity caused by in-office bleaching protocols. *Clin Oral Invest.* 2015; 19: 673-80.

Anderson DG, Chiego DJ, Glickman GN, McCauley LK. A clinical assessment of the effects of 10% carbamide peroxide gel on human pulp tissue. *J Endod.* 1999; 25(4): 247-50.

Baratieri LN, Maia E, Caldeira de Andrada MA, Araújo E. *Caderno de dentística-Clareamento dental.* São Paulo: Editora Santos; 2005. p. 2.

Benetti, AR, Valera, MC, Mancini, MNG, Miranda, CB and Balducci, I. *In vitro* penetration of bleaching agents into the pulp chamber. *Int Endod J.* 2004; 37: 120–124.

Bernardon JK, Sartori N, Ballarin A, Perdigão J, Lopes G, Baratieri LN. Clinical performance of vital bleaching techniques. *Oper Dent.* 2010; 35(1): 3-10.

Bowles WH, Thompson LR. Vital bleaching: the effects of the heat and hydrogen peroxide on pulp enzymes. *J Endod.* 1986; 12(3): 108-12.

Bowles WH, Burns Junior H. Catalase/peroxidase activity in dental pulp. *JOE.* 1992; 18(11): 527-9.

Camargo SEA, Valera MC, Camargo CHR, Mancini MNG, Menezes MM. Penetration of 38% hydrogen peroxide into the pulp chamber in bovine and human teeth submitted to office bleach technique. *J Endod.* 2007; 33: 1074-7.

Campos A, Gonzaga CG, Baratto-Filho F. Repercussões endodônticas dos procedimentos clareadores. *RSBO(on line).* 2011; 8(2).

Carrasco TG, Carrasco-Guerisoli LD, Fröner IC. *In vitro* study of the pulp chamber temperature rise during light-activated bleaching. *J Appl O Sci.* 2008; 16(5): 355-9.

Caviedes-Bucheli J, Ariza-García G, Restrepo-Méndez S, Rios-Osorio N, Lombana N, Muñoz HR. The effect of tooth bleaching on substance P expression in human dental pulp. *J Endod.* 2008; 34: 1462-5.

Coldebella CR, Ribeiro APD, Sacono NT, Trindade FZ, Hebling J, Costa CAS. Indirect cytotoxicity of a 35% hydrogen peroxide bleaching gel on cultured odontoblast-like cells. *Braz Dent J.* 2009; 20(4): 267-74.

Costa CAS, Riehl H, Kina JF, Sacono NT, Hebling J. Human pulp responses to in-office tooth bleaching. *Oral Surg Oral Med Pathol Oral Radiol Endod.* 2010; 109: e59-64.

Dahl JE, Pallesen U. Tooth bleaching- a critical review of the biological aspects. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2003; 14(4): 292-304.

Dawson PFL, Sharif MO, Smith AB, Brunton PA. A clinical study comparing the efficacy and sensitivity of home vs combined whitening. *Ope Dent*. 2011; 36(5): 460-6.

Dias Ribeiro AP, Sacono NT, Lessa FCR, Nogueira I, Condebella CR et al. Cytotoxic effect of a 35% hydrogen peroxide bleaching gel on odontoblast-like MDPC-23 cells. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2009; 108: 458-64.

Hargreaves KM, Goodis HE. *Polpa dentária de Seltzer e Bender*. São Paulo: Quintessence Editora; 2009; 501 páginas.

Hahn P, Schondelmaier N, Wolkewitz M, Altenburger MJ, Polydorou O. Efficacy of tooth bleaching with and without light activation and its effect on the pulp temperature: an in vitro study. *Odontol*. 2013; 101: 67-74.

Hanks CT, FatJC, Wataka JC, Corcoran JF. Cytotoxicity and dentin permeability of carbamide peroxide and hydrogen peroxide vital bleaching materials, *in vitro*. *J Dent Res*. 1993; 72(5): 931-8.

Hanning C, Weinhold HC, Becker K, Attin T. Diffusion of peroxides through dentine *in vitro* with and without prior use of a desensitizing varnish. *Clin Oral Invest*. 2011; 15: 863-8.

Hisks R. Tooth bleaching is vital (letter). *JADA*. 1992; 123(3): 11-4.

Kina JF, Huck C, Riehl H, Martinez TC, Sacono NT et al. Response of human pulps after professional applied vital tooth bleaching. *Int Endod J*. 2010; 43: 572-80.

Kossatz S, Martins G, Loguercio AD, Reis A. Tooth sensitivity and bleaching effectiveness associated with use of a calcium-containing in-office bleaching gel. *JADA*. 2012; 143(12): e81-7.

Kwon SR, Wertz PW, Li Y, Chan DCN. Penetration pattern of rhodamine dyes into enamel and dentin confocal laser microscopy observation. *Int J Cosm Sci*. 2012; 34: 97-101.

Lee DH, Lim BS, Lee YK, Yang HC. Effects of hydrogen peroxide (H₂O₂) on alkaline phosphatase activity and matrix mineralization of odontoblast and osteoblast cell lines. *Cell Biol Toxicol*. 2006; 22: 39-46.

Marson FC, Gonçalves RS, Silva CO, Cintra LTÂ, Pascotto RC et al. Penetration of hydrogen peroxide and degradation rate of different bleaching products. *Oper Dent*. 2015; 40(1): 72-9.

Mena-Serrano AP, Parreiras SO, do Nascimento SEM, Borges CPF, Berger SB et al. Effects of the concentration and composition of in-office bleaching gels on hydrogen peroxide penetration into the pulp chamber. *Open Dent*. 2015; 40(2): E76-E82.

Michida SMA, Passos SP, Marimoto ARK, Garakis MCV, Araújo MAM. Intrapulpal temperature variation during bleaching with various activation mechanisms. *J Appl Oral Sci*. 2009; 17(5): 436-9.

Min KS, Lee HJ, Kim SH, Pae HO et al. Hydrogen peroxidase induces heme oxygenase-1 and dentin sialophosphoprotein mRNA in human pulp cells. *J Endod*. 2008; 34: 983-9.

Paula EA, Nava JÁ, Rosso C, Benazzi CM, Fernandes KT et al. In-office bleaching with a two- and seven- day intervals between clinical sessions: a randomized clinical trial on tooth sensitivity. *J Dent.* 2015; 43: 424-9.

Pontes ECV, Gomes LRM, Soares DGS, Ribeiro APD, Hebling J et al. Citotoxicidade transamelodentinária de uma fita clareadora com 10 % de peróxido de hidrogênio sobre células de linhagem odontoblástica. *Rev Odontol Bras Central.* 2012; 21(56): 376-82.

Reis A, Tay LY, Herrera DR, Kossatz S, Loguercio AD. Clinical effects of prolonged application time of na in-office bleaching gel. *Oper Dent.* 2011; 36(6): 590-6.

Sacono NT, Coldebella CR, Ribeiro APD, Soares DGS, Trindade FZ et al. Cytotoxic effect of a 20% and a 38% hydrogen peroxide bleaching agents on odontoblast-like cells. *Rev Odontol Bras Central.* 2010; 18(48): 15-21.

Soares DG, Basso FG, Hebling J, de Souza Costa CA. Concentration of and application protocols for hydrogen peroxide bleaching gels: effects on pulp cell ciability and whitening efficacy. *J Dent.* 2014; 42: 185-98.

Sulieman M. An overview of bleaching techniques: 2 night guard vital bleaching and non-vital bleaching. *Dental Update.* 2005; 32: 39-46.

Torres CRG, Wiegand A, Sener B, Attin T. Influence of chemical activation of a 35% hydrogen peroxide bleaching gel on its penetration and efficacy- in vitro study. J Dent. 2010; 38: 838-46.

Torres CRG, Souza CS, Borges AB, Huhtala MFRL, Caneppele TMF. Influence of concentration and activation on hydrogen peroxide diffusion through dental tissues in vitro. The Scientific World J. 2013; ID 193241.

Trindade FZ, Ribeiro APD, Sacono NT, Oliveira CF, Lessa FCR et al. Trans-enamel and trans-dentinal cytotoxic effects of a 35% H₂O₂ bleaching gel on cultured odontoblast cell lines after consecutive applications. J Endod J. 2009; 42: 516-24.

Ubal dini ALM, Baesso ML, Medina Neto A, Sato F, Bento AC, Pascotto RC. Hydrogen peroxide diffusion dynamics in dental tissues. J Dent Res. 2013; 92(7): 661-5.