

# ANÁLISE DA CITOTOXICIDADE DE UM GEL CLAREADOR COM 10% DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO SOBRE CÉLULAS ODONTOBLASTÓIDES DE ACORDO COM A ESPESSURA DO SUBSTRATO DENTAL

ANALYSIS OF THE CYTOTOXICITY OF A 10% HYDROGEN PEROXIDE BLEACHING GEL TO ODONTOBLAST-LIKE CELLS ACCORDING TO THE THICKNESS OF DENTAL SUBSTRATE

**Fernanda RUBIO<sup>1</sup>; Diana Gabriela SOARES<sup>2</sup>; Carla Caroline de Oliveira DUQUE<sup>3</sup>; Josimeri HEBLING<sup>4</sup>; Carlos Alberto de Souza COSTA<sup>5</sup>**

1 - Graduada em Odontologia, Departamento de Fisiologia e Patologia, Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista – UNESP.

2 - Pesquisadora do Departamento de Fisiologia e Patologia, Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista – UNESP.

3 - Doutoranda em Reabilitação Oral, Departamento de Prótese e Materiais Odontológicos, Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista – UNESP.

4 - Professora Titular do Departamento de Ortodontia e Clínica Infantil, Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista – UNESP.

5 - Professor Titular do Departamento de Fisiologia e Patologia, Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista – UNESP.

## RESUMO

**Objetivo:** Avaliar a citotoxicidade de um gel clareador contendo 10% de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), aplicado sobre discos de esmalte/dentina simulando diferentes espessuras dentais. **Material e método:** Discos com 2,3; 3,5; e 4,0 mm de espessura foram obtidos para simular incisivos centrais inferiores, incisivos centrais superiores e segundos pré-molares superiores, respectivamente. Para cada espessura, o gel com 10% de  $H_2O_2$  foi aplicado sobre o esmalte por 3x 15 min, 1x 15 min ou 1x 5 min. O protocolo 35%  $H_2O_2$  3x 15 min foi empregado como controle positivo (CP), e nenhum tratamento foi realizado no controle negativo (CN). Células odontoblastóides MDPC-23 foram expostas por 1 h aos componentes da difusão trans-amelodentinária coletados imediatamente após o clareamento, sendo realizada análise da viabilidade celular, estresse oxidativo, deposição de nódulos de mineralização, bem como a quantificação da difusão de  $H_2O_2$

pelos discos. **Resultados:** O gel com 10% de  $H_2O_2$  não promoveu redução significativa da viabilidade celular em relação ao CN para todos os protocolos e espessuras testadas, resultando em valores de difusão de  $H_2O_2$  significativamente inferiores ao CP. Apenas o protocolo 10% 3x 15 min aplicado sobre os discos simulando incisivos promoveu aumento no estresse oxidativo e reduziu a deposição de nódulos de mineralização em relação ao CN; porém, estes efeitos foram significativamente inferiores ao CP. **Conclusão:** De acordo com a metodologia usada neste estudo, foi possível concluir que, independente da espessura dental, a aplicação de um gel clareador com 10% de  $H_2O_2$  por 5-45 min sobre o esmalte causa limitado efeito citotóxico sobre células pulpare.

**PALAVRAS-CHAVE:** Odontoblastos; Clareamento Dental; Citotoxicidade.

## INTRODUÇÃO

A hipersensibilidade desencadeada durante e após o clareamento dental é um efeito indesejável relatado pela grande maioria dos pacientes que são submetidos ao clareamento de consultório<sup>1-6</sup>. Tradicionalmente, esse tipo de procedimento é realizado sob supervisão do cirurgião-dentista, utilizando géis clareadores com elevadas concentrações (30-40%) de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), o quais são aplicados sobre a superfície do esmalte por 30 a 60 minutos por sessão<sup>7,8</sup>. Tem sido sugerido que esta sensibilidade esteja associada à capacidade de difusão do  $H_2O_2$  e de seus subprodutos por toda estrutura dental mineralizada, podendo alcançar a câmara pulpar e induzir um dano químico no tecido conjuntivo pulpar. Tem sido relatado ainda que o contato do  $H_2O_2$  com a polpa pode causar intenso estresse oxidativo associado à morte por necrose celular e, conseqüentemente, induzir uma resposta inflamatória aguda aliada

à expressão de mediadores pró-inflamatórios, resultando em redução da viabilidade e da capacidade de reparo celular<sup>9-14</sup>. De acordo com a literatura, tais danos às células de origem pulpar são proporcionais à concentração de  $H_2O_2$  no gel clareador e ao tempo de contato do produto com a estrutura dental, parâmetros estes diretamente relacionados com o total de  $H_2O_2$  residual capaz de se difundir pela estrutura dental<sup>14,15-17</sup>. Outros pesquisadores têm demonstrado que a intensidade do dano tecidual/celular também apresenta relação com a espessura de esmalte e dentina do dente clareado, sendo observado que o efeito deletério é inversamente proporcional à espessura dental<sup>19,19</sup>. Estudos clínicos também observaram que a sensação dolorosa decorrente do clareamento de consultório empregando-se géis com 35% de  $H_2O_2$  é mais intensa e prevalente em dentes com menor espessura de esmalte e dentina, como os incisivos inferiores e laterais superiores<sup>2,3</sup>.

A redução na concentração de  $H_2O_2$  nos agentes clareadores, bem como do tempo de contato dos produtos com a estrutura dental têm sido alvo de diversas pesquisas na atualidade, visando a determinação de um protocolo de clareamento seguro do ponto de vista biológico<sup>12,15,17,20,21</sup>. Estudos *in vitro* demonstram intensa redução do potencial citotóxico sobre células pulpares<sup>11-13,19</sup>, e estudos clínicos observam menores índices de sensibilidade dental<sup>21-24</sup>. No entanto, o principal efeito negativo destes tratamentos alternativos é a redução da eficácia clareadora a curto prazo<sup>15</sup>. Em estudo recente, Duque *et al.*<sup>19</sup> (2017) demonstraram que o uso de um gel clareador com 10% de  $H_2O_2$  foi capaz de minimizar intensamente a toxicidade do clareamento de consultório tradicional (35% 3x 15 min) sobre células pulpares humanas, sendo que quando este gel aplicado foi por uma ou três vezes de 15 min em discos simulando incisivos inferiores obteve-se o mesmo padrão de clareamento que o protocolo tradicional, após 6 e 4 sessões, respectivamente. Assim, estes protocolos alternativos parecem ser biologicamente interessantes e esteticamente eficazes para serem realizados em dentes com pequena espessura de esmalte e dentina.

É importante salientar que os odontoblastos são as primeiras células da polpa a entrarem em contato com qualquer componente capaz de se difundir pela estrutura dental e atingir o tecido pulpar, sendo os mesmos responsáveis pela modulação da resposta imune e inflamatória pulpar, bem como pelo potencial regenerativo do complexo dentino-pulpar<sup>25,26</sup>. Estudos prévios demonstraram que, dependendo da intensidade do estresse oxidativo causado por componentes de géis clareadores sobre células odontoblastóides *in vitro*, pode ocorrer inibição da expressão de marcadores de maturação celular, interferindo negativamente com a capacidade destas células em depositar matriz mineralizada<sup>17</sup>. Assim, o presente estudo teve como objetivo principal avaliar o efeito da espessura dental sobre a viabilidade, estresse oxidativo e características fenotípicas de células odontoblastóides mediadas pelo gel clareador contendo 10% de  $H_2O_2$  aplicado por diferentes períodos na estrutura dental.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Obtenção dos discos de esmalte/dentina

Os discos de esmalte/dentina foram coletados na porção média da face vestibular de incisivos bovinos (novilhos com 24 e 30 meses). Dentes com manchas, desgaste excessivo do terço incisal, alterações morfológicas da coroa e trincas no esmalte foram descartados. Os discos foram obtidos a partir de uma broca diamantada trefina (Dinser brocas diamantadas LTDA, São Paulo, SP, Brasil) acoplada a uma furadeira de bancada (FSB 16 Pratika, Schultz, Joinville, SC, Brasil) em ambiente submerso em água a 4°C, obtendo-se discos com diâmetro padronizado em 5,6 mm. Os discos coletados tiveram suas espessuras de esmalte e dentina mensuradas com paquímetro digital. Em seguida, a superfície dentinária foi desgastada com lixas d'água de granulação 400 e 600 (T469-SF- Noton, Saint-Gobain Abrasivos Ltda., Jundiaí, SP, Brasil) para padronização da espessura total de esmalte/dentina. Os discos foram então distribuídos nos seguintes grupos: Grupo II (incisivos centrais inferiores) - espessura total =  $2,30 \pm 0,20$  mm; Grupo IS (incisivos centrais

superiores) - espessura total =  $3,50 \pm 0,20$  mm; Grupo PM (segundos pré-molares superiores) - espessura total =  $4,00 \pm 0,20$  mm. As espessuras dos Grupos II e PM foram baseadas na metodologia proposta por Duque *et al.*<sup>19</sup> (2017), e a espessura do Grupo IS foi baseada em Harris *et al.*<sup>27</sup> (1998) e Sarig *et al.*<sup>28</sup> (2015), sendo amplamente empregada na literatura em metodologias similares à proposta neste experimento<sup>16,29</sup>. A superfície de dentina dos discos foi tratada com solução de EDTA 0,5 N durante 30 s seguido de lavagem com água deionizada, para remoção da smear layer<sup>16,19,29</sup>. A superfície de esmalte não sofreu desgastes superficiais, sendo a mesma submetida a profilaxia com solução de pedra-pomes e água em baixa rotação para remoção de pigmentos superficiais.

### Protocolos de clareamento

Para cada espessura dental simulada (Grupos II, IS e PM), os seguintes tratamentos foram realizados no esmalte: Controle - nenhum tratamento foi realizado sobre a superfície de esmalte (grupo controle negativo = 100% dos parâmetros celulares); 35%  $H_2O_2$  3x 15 min - protocolo de clareamento de consultório tradicional caracterizado pela aplicação de um gel com 35% de  $H_2O_2$  (Whiteness HP, FGM, Joinville, SC, Brasil) por três vezes de 15 min (grupo controle positivo); 10% 3x 15 min - aplicação de um gel com 10% de  $H_2O_2$  por três vezes de 15 min; 10% 1x 15 min - aplicação de um gel com 10% de  $H_2O_2$  por uma vez de 15 min; 10% 1x 5 min - aplicação de um gel com 10% de  $H_2O_2$  por uma vez de 5 min. O protocolo 35%  $H_2O_2$  3x 15 min foi empregado como controle positivo, visto que este apresenta resultados de citotoxicidade trans-amelodentinária sobre as células odontoblastóides padronizada na literatura para as metodologias utilizadas na presente investigação<sup>11,19,30</sup>. A concentração experimental 10% de  $H_2O_2$  foi selecionada com base em dados de estudos prévios que demonstraram efeito tóxico limitado sobre células pulpares humanas *in vitro* em comparação com o protocolo tradicional<sup>12,19</sup>. O gel experimental com 10% de  $H_2O_2$  foi obtido a partir da diluição do líquido do gel com 35% de  $H_2O_2$  em água deionizada (1:6). A diluição foi realizada imediatamente antes da aplicação do gel sobre o espécime<sup>19</sup>.

### Cultivo celular

As células imortalizadas da linhagem odontoblastica (MDPC-23) utilizadas no presente estudo foram cultivadas e subcultivadas em garrafas de 75 cm<sup>2</sup> (Corning Inc.) com meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) contendo 10% de soro fetal bovino (SFB), 100 IU/mL e 100 mg/mL, respectivamente de penicilina e estreptomicina, e 2 mmol/L de glutamina (GIBCO), em uma atmosfera umedecida à 37°C, com 5% de  $CO_2$ <sup>17</sup>. Para realização do experimento, um total de  $1 \times 10^4$  células foram semeadas em placas de 96 compartimentos, sendo incubadas por um período de 24 h a 37°C e 5% de  $CO_2$ , obtendo-se um padrão de 80% de confluência.

### Protocolo experimental

Os discos foram adaptados no compartimento superior de câmaras pulpares artificiais (CPA) por meio de dois anéis de silicone. A região dos anéis de silicone foi selada com cera utilidade de forma a impedir o contato do gel clareador com esta região. Em seguida, os conjuntos disco/CPA foram esterilizados por óxido

de etileno<sup>16,19,30,31</sup>. Um total de 30 conjuntos disco/CPA foram obtidos para cada espessura (n = 6), sendo estes posicionados individualmente em placas de 24 compartimentos contendo 1 mL de DMEM sem SFB. A superfície de esmalte permaneceu exposta, e o meio de cultura em íntimo contato com a dentina. Assim, imediatamente após a realização do clareamento no esmalte, os componentes dos géis clareadores capazes de se difundir por toda espessura dental se acumularam no meio de cultura, denominado neste momento de extrato. Os extratos foram homogeneizados e distribuídos em alíquotas de 100 µL, as quais foram aplicadas por um período de 1 h (37°C e 5% de CO<sub>2</sub>) sobre as células previamente semeadas. As análises celulares foram realizadas em dois períodos: T0 = imediatamente após a exposição das células aos extratos; T7 = imediatamente após exposição aos extratos, estes foram aspirados e as células foram cultivadas por 7 dias em meio de cultura DMEM completo com 10% de SFB (meio foi renovado a cada 72 horas).

#### *Análise da viabilidade celular*

No período T0, as células (n = 6) foram incubadas com DMEM sem SFB suplementado com 5 mg/mL do sal de MTT ((3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; Sigma) na proporção 10:1, sendo o conjunto incubado por 4 h a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Em seguida, os cristais de formazan foram dissolvidos em isopropanol acidificado, sendo a absorbância mensurada a 570 nm (Synergy H1, BioTek, Winooski, VT, EUA). A média de absorbância do grupo controle correspondente de cada espessura foi considerada como 100% de viabilidade celular, sendo a porcentagem de viabilidade celular para os grupos clareados calculada.

#### *Estresse oxidativo*

Este teste foi realizado em T0 com o objetivo de estimar a quantidade de espécies reativas do oxigênio (EROs) produzidas pelas células imediatamente após o clareamento. Para isso, inicialmente, as células MDPC-23 foram pré-tratadas com a sonda fluorescente carboxy-H<sub>2</sub>DCFDA (5 µM por 30 min) (Life Technologies, San Francisco, CA, EUA) (n = 6), a qual é permeável às membranas celulares e emite fluorescência esverdeada (FITC) quando em contato com as EROs. Em seguida, as células foram expostas aos extratos, sendo a intensidade de fluorescência avaliada a 592 nm excitação e 517 nm emissão (Synergy H1). Os dados obtidos foram normalizados pelo grupo controle negativo, para cada espessura.

#### *Deposição de nódulos de mineralização*

Após 7 dias do procedimento clareador (T7), foi analisada a capacidade das células MDPC-23 em depositar dos nódulos de mineralização pelo teste de *Alizarin Red*. As células foram fixadas com etanol a 70% a 4°C por 1 h, sendo em seguida realizada lavagem com água deionizada e incubação com solução de *Alizarin Red* (40 mM, pH 4.2; Sigma) durante 15 min sob agitação. As células foram então lavadas com água deionizada, e foi aplicada solução de cloreto de cetilpiridíneo (10 mM, pH 7.0; Sigma) por 15 min com a finalidade de dissolver os nódulos. A leitura da absorbância foi feita a 570 nm (Synergy H1). O valor médio de absorbância do controle negativo (para cada espessura) foi considerado como 100% de coloração positiva.

#### *Quantificação do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nos extratos*

Imediatamente após o clareamento (T0), uma alíquota de 100 µL de extrato de cada grupo experimental (n = 6) foi transferido para compartimentos contendo 900 µL de solução tampão acetato para estabilização do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Em seguida, 500 µL desta solução (solução tampão mais o extrato) foram transferidos para tubos de ensaio contendo água e corante violeta leucocristal (0,5 mg/mL; Sigma). Os tubos foram então agitados e adicionou-se 50 µL da enzima horseradish peroxidase (1 mg/mL; Sigma). A absorbância das soluções foi mensurada em espectrofotômetro com comprimento de onda de 596 nm. Uma curva padrão de quantidades conhecidas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi utilizada para a conversão dos valores de densidade óptica obtidos das amostras em mg de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por mL de extrato<sup>16</sup>.

#### *Análise estatística*

Para verificar a reprodutibilidade dos dados, dois experimentos independentes foram realizados para todos os protocolos neste estudo. Em seguida, os dados compilados foram submetidos ao teste de Kolmogorov-Smirnov e Levene para verificação dos aspectos de normalidade e homocedasticidade. Os dados obtidos foram avaliados pelo teste de ANOVA a dois critérios. O teste de Sidak foi empregado para identificação das diferenças entre as espessuras (Grupo II x Grupo IS x Grupo PM), para cada protocolo de clareamento. O teste de Tukey foi utilizado para identificação das diferenças entre os protocolos de clareamento, dentro de cada espessura de esmalte/dentina. Todas as inferências estatísticas foram realizadas com nível de significância de 5%.

## RESULTADOS

#### *Viabilidade celular*

Diferença estatisticamente significativa entre as espessuras testadas foi detectada apenas para o protocolo 35% 3x 15 min, onde as células expostas aos extratos dos Grupos II e IS apresentaram valores de viabilidade celular significativamente inferiores àquelas expostas aos extratos do Grupo PM. Este protocolo também promoveu redução significativa da viabilidade celular em relação ao controle negativo para todas as espessuras testadas. O gel com 10% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> não causou redução significativa da viabilidade celular em relação ao controle negativo, independente da espessura de esmalte/dentina dos discos, ou do tempo de contato com a estrutura dental. Os dados de viabilidade celular estão demonstrados na Figura 1.

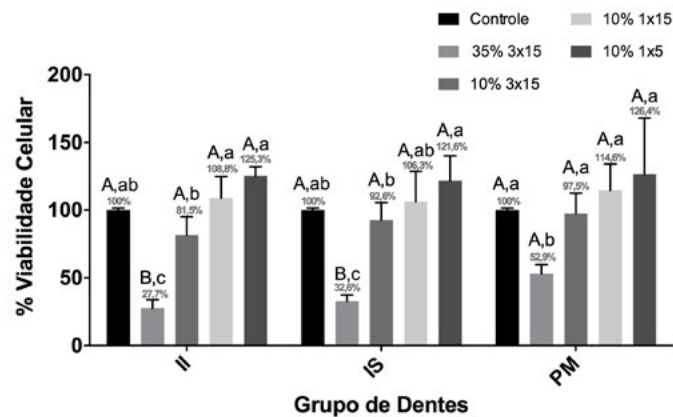
#### *Estresse oxidativo*

Todos os grupos clareados com o protocolo tradicional (35% 3x 15 min) apresentaram aumento significativo do estresse oxidativo quando comparados ao grupo controle negativo e aos grupos expostos ao gel com 10% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, para todas as espessuras testadas. Para este protocolo, a espessura dental não apresentou influência significativa nos resultados obtidos. Com relação ao gel experimental com 10% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, aumento significativo do estresse oxidativo em relação ao controle negativo foi detectado apenas nos grupos relativos aos incisivos (Grupos II e IS), quando submetidos ao protocolo 10% 3x 15 min. Pode ser observado que este protocolo promoveu estresse oxidativo

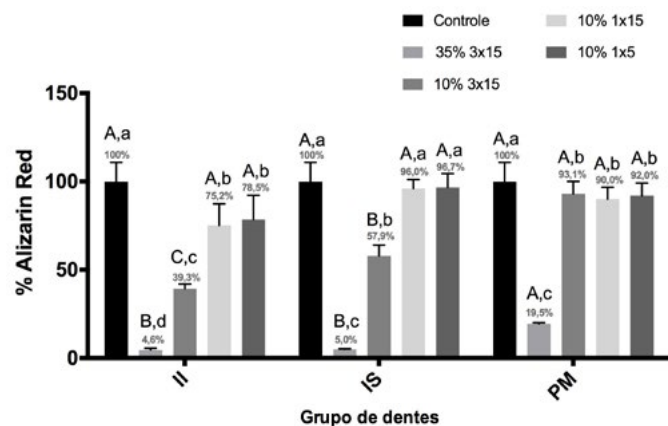
significativamente inferior no Grupo PM quando comparado aos Grupos II e IS, demonstrando o efeito protetor da espessura dental. Os resultados para estresse oxidativo estão demonstrados na Figura 2.

#### Deposição dos nódulos de mineralização

Intensa redução na deposição de nódulos de mineralização foi detectada nos grupos expostos ao protocolo tradicional, sendo este efeito mais intenso nos Grupos II e IS em comparação ao Grupo PM. No Grupo II, todos os protocolos experimentais com o gel contendo 10% de  $H_2O_2$  resultaram em redução significativa na deposição de nódulos de mineralização em comparação ao controle, sendo em torno de 60,7%, 24,8% e 21,5% para os protocolos 3x 15 min, 1x 15 min e 1x 5 min. Já no Grupo IS, apenas o protocolo 10% 3x 15 min promoveu redução significativa (42,1%) na deposição de nódulos de mineralização em comparação ao controle, sendo que nenhum protocolo para o gel com 10% de  $H_2O_2$  reduziu significativamente este parâmetro celular no Grupo PM (Figura 3).



**Figura 1** - Gráfico de barras dos valores médios (números) e desvio-padrão da viabilidade celular (Teste do MTT). Letras minúsculas permitem comparações entre os protocolos de clareamento dentro de cada grupo de dentes (ANOVA/Tukey). Letras maiúsculas permitem comparações entre os grupos de dentes (II, IS e PM) para cada protocolo de clareamento separadamente (ANOVA/Sidak). Letras diferentes indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ;  $n = 6$ ).



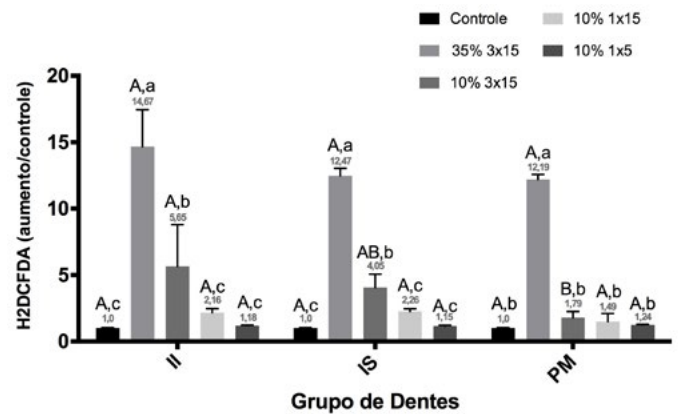
**Figura 3** - Gráfico de barras dos valores médios (números) e desvio-padrão para deposição dos nódulos de mineralização. Letras minúsculas permitem comparações entre os protocolos de clareamento dentro de cada grupo de dentes (ANOVA/Tukey). Letras maiúsculas permitem comparações entre os grupos de dentes (II, IS e PM) para cada protocolo de clareamento separadamente (ANOVA/Sidak). Letras diferentes indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ;  $n = 6$ ).

#### Difusão de $H_2O_2$

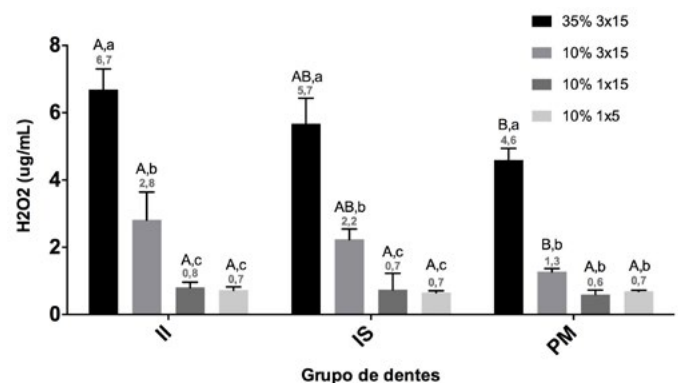
O protocolo 35% 3x 15 min resultou os maiores valores de difusão de  $H_2O_2$  pela estrutura dental, a qual foi proporcional à espessura de esmalte/dentina dos discos. Redução significativa na difusão de  $H_2O_2$  em relação a este grupo foi detectada quando o gel com 10% de  $H_2O_2$  foi empregado. Quando o protocolo 10% 3x 15 min foi aplicado nos discos simulando incisivos (Grupos II e IS), foi observada difusão de  $H_2O_2$  significativamente superior àquela observada nos discos expostos aos protocolos 10% 1x 15 min e 10% 1x 5 min; no entanto, este efeito não foi observado no Grupo PM (Figura 4).

#### DISCUSSÃO

De acordo com Duque *et al.*<sup>19</sup> (2017), a aplicação de géis clareadores sobre discos de esmalte/dentina com espessura similar à incisivos inferiores (2,3 mm) permite maior difusão trans-amelodentinária de  $H_2O_2$  residual em comparação à discos que simulam a espessura de pré-molares (4,0 mm), resultando em dano oxidativo mais intenso sobre uma cultura primária de células



**Figura 2** - Gráfico de barras dos valores médios (números) e desvio-padrão para o teste do estresse oxidativo (aumento relativo ao controle para a fluorescência da sonda carboxy-H2DCFDA). Letras minúsculas permitem comparações entre os protocolos de clareamento dentro de cada grupo de dentes (ANOVA/Tukey). Letras maiúsculas permitem comparações entre os grupos de dentes (II, IS e PM) para cada protocolo de clareamento separadamente (ANOVA/Sidak). Letras diferentes indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ;  $n = 6$ ).



**Figura 4** - Gráfico de barras dos valores médios (números) e desvio-padrão para quantificação da difusão de peróxido de hidrogênio imediatamente após o clareamento (teste da violeta leuco-cristal/peroxidase). Letras minúsculas permitem comparações entre os protocolos de clareamento dentro de cada grupo de dentes (ANOVA/Tukey). Letras maiúsculas permitem comparações entre os grupos de dentes (II, IS e PM) para cada protocolo de clareamento separadamente (ANOVA/Sidak). Letras diferentes indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ;  $n = 6$ ).

pulpare humanas. No presente estudo, o efeito de três espessuras dentais sobre o potencial tóxico de diferentes protocolos de clareamento foi avaliado sobre células odontoblastóides *in vitro*. Os odontoblastos são células terminais que revestem internamente a dentina, apresentando seus prolongamentos no interior dos túbulos dentinários<sup>32</sup>. Estas células são consideradas como a primeira linha de defesa do complexo dentino-pulpar contra qualquer agressão externa, desde que a mesma é capaz de modular a resposta imune inata do tecido pulpar<sup>26</sup>. Diante de uma agressão de baixa intensidade, a resposta destas células também envolve a deposição de dentina terciária (reacional) na câmara pulpar, com o objetivo de afastar a polpa da fonte de agressão; no entanto, em agressões intensas, capazes de causar a morte dos odontoblastos, existe a necessidade de recrutar células tronco e induzir sua diferenciação em células odontoblastóides para repor as células mortas e manter a vitalidade pulpar<sup>25</sup>. Já está bem estabelecido na literatura contemporânea que o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> proveniente de agentes clareadores é capaz de causar a morte de células odontoblastóides *in vitro*, mediado por intenso estresse oxidativo, o qual gera lesão na membrana celular, bem como de interferir negativamente na capacidade destas células em expressar fenótipo odontoblastóide (expressão de DSPP, DMP-1 e ALP). Estes efeitos negativos são proporcionais à concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em contato com as células<sup>17</sup>. Desta forma, fica evidente a necessidade de se estabelecer protocolos de clareamento que minimizem a difusão de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> residual, mantendo a viabilidade e atividade fenotípica dos odontoblastos, evitando-se, assim, envelhecimento precoce do tecido pulpar e mantendo sua intensa capacidade de reparo<sup>25</sup>.

De acordo com os resultados da presente investigação, pôde-se observar intensa redução da viabilidade celular, em torno de 72,3%; 67,4%; e 47,1% para os Grupos II, IS e PM, respectivamente, quando as células odontoblastóides MDPC-23 foram expostas aos extratos obtidos após realização do protocolo de clareamento tradicional 35% 3x15 min. Estes resultados corroboram com estudos prévios, onde discos de esmalte/dentina com 3,5 mm de espessura foram clareados. Nestes estudos, os pesquisadores demonstraram que a redução da viabilidade das células MDPC-23 estava associada a alterações na morfologia celular, indução de estresse oxidativo, aumento na expressão de mediadores pró-inflamatórios e ruptura da membrana celular<sup>30,33-35</sup>. Avaliando-se o efeito da espessura dental para estes resultados, foi possível detectar valores de viabilidade em torno de 1,9 e 1,6 vezes superiores no Grupo PM em comparação aos Grupos II e IC, respectivamente. Este efeito pode estar relacionado com a concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> difundido pela estrutura dental, visto que o Grupo PM apresentou valores de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no extrato significativamente inferiores aos Grupos II e IS. Assim, ficou demonstrado que a espessura dental similar aos pré-molares humanos preveniu a citotoxicidade trans-amelodentinária do clareamento de consultório tradicional sobre as células odontoblastóides *in vitro*. Em contrapartida, as variações nas espessuras dos incisivos simuladas não apresentaram efeito protetor significativo quando comparadas entre si.

Tal como demonstrado anteriormente<sup>11</sup>, a redução na viabilidade das células MDPC-23 expostas aos extratos do protocolo 35% 3x 15 min pode ser uma consequência do estabelecimento de um estresse oxidativo patológico, desde que os maiores valores de intensidade de fluorescência para a sonda carboxy-H<sub>2</sub>DCFDA

foram observados para este protocolo de clareamento. A condição de estresse oxidativo no tecido pulpar mediado pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> proveniente de géis clareadores tem sido considerada como fator desencadeante de uma reação inflamatória tecidual aguda *in vivo* com consequente expressão de proteases teciduais e degradação da matriz extracelular, levando à condição de necrose tecidual<sup>9,10,18,36</sup>. De acordo com estudos laboratoriais prévios, a indução de intenso estresse oxidativo em células MDPC-23 e células pulpare humanas mediado pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, resulta em redução na expressão gênica de marcadores odontogênicos, tais como ALP, DSPP e DMP-1, os quais foram associados à intensa redução na deposição de matriz mineralizada<sup>12,14,16,17,37</sup>. As células MDPC-23 expostas ao protocolo 35% 3x 15 min no presente estudo também apresentaram redução na sua capacidade de reparo, desde que foi observada redução significativa na deposição de nódulos de mineralização em torno de 95,4%; 95,0% e 80,5%, para os grupos para os Grupos II, IS e PM, respectivamente.

Na presente investigação, o protocolo de clareamento 10% 3x 15 min resultou em difusão de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em todas as espessuras estudadas comparado ao controle negativo. No entanto, esta difusão foi significativamente menor ao protocolo 35% 3x 15 min, e não causou redução significativa na viabilidade celular em comparação ao controle negativo para todas as espessuras estudadas. O Grupo PM obteve a menor difusão de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, sendo significativamente inferior aos Grupos II e IS. Além disso, foi demonstrado que o protocolo 10% 3x 15 min resultou em aumento do estresse oxidativo apenas nas células dos Grupos II e IS, associada a discreta redução de 18,5% e 7,4% na viabilidade celular, respectivamente. Também foi observado alteração significativa da capacidade de reparo celular, desde que redução na deposição dos nódulos de mineralização em torno de 60,7% e 42,1%, foi detectada para os Grupos II e IS, respectivamente. Estas alterações não foram detectadas no Grupo PM. Quando o tempo de contato do gel contendo 10% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi reduzido para 15 ou 5 min, houve redução significativa na difusão de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> residual em comparação ao protocolo 10% 3x 15 min, não tendo sido detectadas diferenças para os parâmetros celulares testados em relação com o grupo controle negativo.

De acordo com os resultados obtidos no presente estudo, podemos sugerir que os dentes anteriores podem ser considerados como aqueles mais suscetíveis ao desencadeamento dos efeitos adversos do clareamento dental sobre o complexo dentino-pulpar. Esse fato é corroborado pelo estudo histopatológico realizado por de Souza Costa *et al.*<sup>9</sup> (2010), o qual demonstrou que pré-molares de pacientes jovens clareados com gel a 38% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 45 min não apresentaram alterações no tecido pulpar, enquanto que nos incisivos inferiores foi observada ampla área de necrose de coagulação na porção coronária, associada à reação inflamatória no remanescente pulpar. Em outro estudo, Roderjan *et al.*<sup>18</sup> (2014) demonstraram que ao empregar o protocolo tradicional (35% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3x 15 min) em incisivos inferiores, 100% dos pacientes jovens (dentes com espessura média de dentina 1,77 ± 0,08 mm) apresentaram necrose parcial da polpa coronária, sendo que este dano ocorreu nos incisivos de 60% dos pacientes idosos (espessura média de dentina 1,99 ± 0,10 mm). Bonafé *et al.*<sup>3</sup> (2013) demonstraram que pacientes submetidos ao clareamento de consultório com um gel contendo 35% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 3x 15 min relataram hipersensibilidade em 0% dos pré-molares, 30%

dos caninos, 53,3% dos incisivos centrais, e 76,7% dos incisivos laterais (arcada superior). Outro estudo clínico realizado por de Almeida *et al.*<sup>2</sup> (2012), onde foi empregado um gel com 35% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aplicado por 3x 10 min, demonstrou que cerca de 75% dos pacientes relataram sensibilidade nos dentes anteriores, enquanto que nenhuma sensibilidade foi detectada nos dentes posteriores.

De forma geral, os resultados do presente estudo demonstram que o gel com 10% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> reduz intensamente a toxicidade do clareamento de consultório *in vitro* sobre as células MDPC-23, sendo que apenas quando o tempo de contato foi de 45 min houve influencia da espessura dental nos parâmetros celulares. É importante deixar claro que os resultados obtidos a partir de estudos *in vitro* são superestimados, e não podem ser diretamente transportados para a condição clínica, visto que diversos fatores, tais como pressão intrapulpar, presença de componentes orgânicos dentro dos túbulos dentinários, bem como presença de uma matriz extracelular, minimizam efetivamente o efeito negativo de géis clareadores no tecido pulpar. De acordo com estudos histopatológicos previamente discutidos, a terapia tradicional não promove danos pulpares em pré-molares humanos<sup>9,38</sup>, sendo que na presente investigação este protocolo promoveu discreta toxicidade sobre as MDPC-23, mesmo quando aplicado sobre os discos simulando a espessura de pré-molares. Conforme demonstrado por Duque *et al.*<sup>19</sup> (2017), os protocolos 10% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3x 15 min e 1x 15 min foram capazes de promover clareamento similar ao protocolo tradicional quando aplicado sobre estrutura dental simulando incisivos inferiores dentro de 4-6 sessões. Desta forma, todos os protocolos testados para o gel com 10% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> apresentam-se como protocolos clareadores promissores para serem direcionados aos dentes com menor espessura de esmalte/dentina em futuras pesquisas clínicas, o que poderá resultar no desenvolvimento de terapias clareadoras de consultório esteticamente viáveis e biologicamente compatíveis com o complexo dentino-pulpar.

## CONCLUSÃO

De acordo com a metodologia usada neste estudo, foi possível concluir que, independente da espessura dental, a aplicação de um gel clareador com 10% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 5-45 min sobre o esmalte causa limitado efeito citotóxico sobre células pulpares.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Processos 2015/21770-4 e 2015/21294-8) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (Processos 303599/2014-6 e 442336/2014-4) pelo financiamento deste estudo.

## REFERÊNCIAS

01. Tay LY, Kose C, Loguercio AD, Reis A. Assessing the effect of a desensitizing agent used before in-office tooth bleaching. *J Am Dent Assoc.* 2009; 140(10): 1245-1251.
02. Almeida LCAG, Souza Costa CA, Riehl H, Santos PH, Sundfeld RH, Briso ALF. Occurrence of sensitivity during at-home and in-office tooth bleaching therapies with or without use of light sources. *Acta Odontol Latinoam.* 2012; 25(1): 3-8.
03. Bonafé E, Bacovis CL, Jensen S, Loguercio AD, Reis A, Kossatz S. Tooth sensitivity and efficacy of in-office bleaching in restored teeth. *J Dent.* 2013; 41(4): 363-9.
04. Mondelli RFL, Azevedo JFDG, Francisoni AC, Almeida CM, Ishikiriama SK. Comparative clinical study of the effectiveness of different dental bleaching methods - two year follow-up. *J Appl Oral Sci.* 2011; 20(4): 435-443.
05. Graziolia G, Valente LL, Isolan CP, Pinheiro HA, Duarte CG, Münchow EA. Bleaching and enamel surface interactions resulting from the use of highly-concentrated bleaching gels. *Arch Oral Biol.* 2018; 87: 157-162.
06. Fernandes MT, Vaez SC, Lima CM, Nahsan FP, Loguercio AD, Fariae-Silva AL. Preemptive use of naproxen on tooth sensitivity caused by in-office bleaching: a triple-blind, crossover, randomized clinical trial. *Oper Dent.* 2017; 42(5): 486-496.
07. Maran BM, Burey A, Matos TP, Loguercio AD, Reis A. In-office dental bleaching with light vs. without light: A systematic review and meta-analysis. *J Dent.* 2017; 70: 1-13.
08. Wang YGJ, Jiang T, Liang S, Zhou Y, Matis BA. Evaluation of the efficacy of potassium nitrate and sodium fluoride as desensitizing agents during tooth bleaching treatment - A systematic review and meta-analysis. *J Dent.* 2015; 43(8): 913-23.
09. Souza-Costa CA, Riehl H, Kina JF, Sacono NT, Hebling J. Human pulp responses to in-office tooth bleaching. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2010; 109(4): e59-64.
10. Cintra LTA, Benetti F, Silva-Facundo ACS, Ferreira LL, Gomes-Filho JE, Ervolino E, et al. The number of bleaching sessions influences pulp tissue damage in rat teeth. *J Endod.* 2013; 39(12): 1576-80.
11. Soares DG, Basso FG, Hebling J, de Souza Costa CA. Concentrations of and application protocols for hydrogen peroxide bleaching gels: effects on pulp cell viability and whitening efficacy. *J Dent.* 2014; 42(2): 185-98.
12. Soares DG, Basso FG, Hebling J, Souza-Costa CA. Immediate and late analysis of dental pulp stem cells viability after indirect exposition to alternative in-office bleaching strategies. *Clin Oral Investig.* 2015; 19(5): 1013-1020.
13. Cintra LT, Benetti F, Ferreira LL, Gomes-Filho JE, Ervolino E, Gallinari MO, et al. Penetration capacity, color alteration and biological response of two in-office bleaching protocols. *Braz Dent J.* 2016; 27(2): 169-75.
14. Soares DG, Basso FG, Hebling J, Souza-Costa CA. Effect of hydrogen-peroxide-mediated oxidative stress on human dental pulp cells. *J Dent.* 2015; 43(6): 750-6.
15. Soares DG, Basso FG, Pontes EC, Garcia LF, Hebling J, Souza-Costa CA. Effective tooth-bleaching protocols capable of reducing H(2) O(2) diffusion through enamel and dentine. *J Dent.* 2014; 42(3): 351-8.
16. Soares DG, Ribeiro AP, Silveira-Vargas F, Hebling J, Souza-Costa CA. Efficacy and cytotoxicity of a bleaching gel after short application times on dental enamel. *Clin Oral Invest.* 2013; 17(8): 1901-9.
17. Soares DG, Marcomini N, Basso FG, Pansani TN, Hebling J, Souza-Costa CA. Indirect cytocompatibility of a low-concentration hydrogen peroxide bleaching gel to odontoblastlike cells. *Int Endod J.* 2016; 49(1): 26-36.
18. Roderjan DA, Stanislawczuk R, Hebling J, Souza-Costa CA, Soares DG, Reis A, et al. Histopathological features of dental pulp tissue from bleached mandibular incisors. *J Mater Sci Eng B.* 2014; 4: 178-185.
19. Duque CCO, Soares DG, Basso FG, Hebling J, Souza-Costa CA. Influence of enamel/dentin thickness on the toxic and esthetic effects of experimental in-office bleaching protocols. *Clin Oral Investig.* 2017; 21(8): 2509-2520.
20. Soares DG, Basso FG, Scheffel DS, Hebling J, Souza-Costa CA. Responses of human dental pulp cells after application of a low-

- concentration bleaching gel to enamel. *Arch Oral Biol.* 2015; 60(9): 1428-36.
21. Bortolatto JF, Trevisan TC, Bernardi PS, Fernandez E, Dovigo LN, Loguercio AD, et al. A novel approach for in-office tooth bleaching with 6% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/TiO<sub>2</sub> and LED/laser system-a controlled, triple-blinded, randomized clinical trial. *Lasers Med Sci.* 2016; 31(3): 437-44.
  22. Gonçalves MLL, Tavares ACDS, Mota ACCD, Penna LAP, Deana AM, Bussadori SK. In-Office Tooth Bleaching for Adolescents Using Hydrogen Peroxide-Based Gels: Clinical Trial. *Braz Dent J.* 2017; 28(6): 720-725.
  23. Bortolatto JF, Pretel H, Floros MC, Luizzi ACC, Dantas AAR, Fernandez E, et al. Low concentration H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/TiO<sub>2</sub> in office bleaching: a randomized clinical trial. *J Dent Res.* 2014; 93 (Suppl 7): 66S-71S.
  24. Lima SNL, Ribeiro IS, Grisotto MA, Fernandes ES, Hass V, Jesus-Tavarez RR, et al. Evaluation of several clinical parameters after bleaching with hydrogen peroxide at different concentrations: A randomized clinical trial. *J Dent.* 2018; 68: 91-7.
  25. Souza-Costa CA, Hebling J, Schefell DLS, Soares DGS, Basso FG, Ribeiro APD. Methods to evaluate and strategies to improve the biocompatibility of dental materials and operative techniques. *Dent Mater.* 2014; 30(7): 769- 84.
  26. Soares DG, Hebling J, Souza-Costa CA. Human pulpal responses to peroxides. In: Perdigão J. *Tooth-whitening: an evidence-based perspective.* Minneapolis: Springer; 2016.
  27. Harris EF, Hicks JD. A radiographic assessment of enamel thickness in human maxillary incisors. *Arch Oral Biol.* 1998; 43(10): 825-31.
  28. Sarig R, Vardimon AD, Sussan C, Benny L, Sarne O, Hershkovitz I, et al. Pattern of maxillary and mandibular proximal enamel thickness at the contact area of the permanent dentition from first molar to first molar. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2015; 147(4): 435-44.
  29. Duque CC, Soares DG, Basso FG, Hebling J, Souza-Costa CA. Bleaching effectiveness, hydrogen peroxide diffusion, and cytotoxicity of a chemically activated bleaching gel. *Clin Oral Investig.* 2014; 18(6): 1631-7.
  30. Almeida LC, Soares DG, Gallinari MO, Souza -Costa CA, Santos PH, Briso AL. Color alteration, hydrogen peroxide diffusion, and cytotoxicity caused by inoffice bleaching protocols. *Clin Oral Investig.* 2015; 19(3): 673-80.
  31. Almeida LC, Soares DG, Azevedo FA, Gallinari MO, Costa CA, Santos PH, et al. At-Home Bleaching: Color Alteration, Hydrogen Peroxide Diffusion and Cytotoxicity. *Braz Dent J.* 2015; 26(4): 378-83.
  32. Goldberg M, Grootveld M, Lynch E. Undersirable and adverse effects of tooth whitening products: a review. *Clin Oral Investig.* 2010; 14(1): 1-10.
  33. Lima AF, Ribeiro AP, Soares DG, Sacono NT, Hebling J, Souza-Costa CA. Toxic effects of daily applications of 10% carbamide peroxide on odontoblast-like MDPC-23 cells. *Acta Odontol Scand.* 2013; 71(5): 1319-25.
  34. Soares DG, Ribeiro AP, Sacono NT, Coldebella CR, Hebling J, Souza-Costa CA. Transenamel and transdental cytotoxicity of carbamide peroxide bleaching gels on odontoblast-like MDPC-23 cells. *Int Endod J.* 2011; 44(2): 116-25.
  35. Trindade FZ, Ribeiro AP, Sacono NT, Oliveira CF, Lessa FC, Hebling J, et al. Trans-enamel and trans-dental cytotoxic effects of a 35% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bleaching gel on cultured odontoblast cell lines after consecutive applications. *Int Endo J.* 2009; 42(6): 516-24.
  36. Roderjan DA, Stanislawczuk R, Hebling J, Costa CA, Reis A, Loguercio AD. Response of human pulps to different in-office bleaching techniques: preliminary findings. *Braz Dent J.* 2015; 26(3): 242-8.
  37. Lee YH, Kang YM, Heo MJ, Kim GE, Bhattarai G, Lee NH, et al. The survival role of peroxisome proliferator-activated receptor gamma induces odontoblast differentiation against oxidative stress in human dental pulp cells. *J Endod.* 2013; 39(2): 236-41.
  38. Kina JF, Huck C, Riehl H, Martinez TC, Sacono NT, Ribeiro AP, et al. Response of human pulps after professionally applied vital tooth bleaching. *Int Endod J.* 2010; 43(7): 572-80.

## ABSTRACT

**Objective:** To evaluate the cytotoxicity of a bleaching gel with 10% hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) applied onto enamel/dentin discs simulating different dental thicknesses. **Material and methods:** Discs with 2.3; 3.5; and 4.0 mm thickness were obtained to simulate low central incisors, upper central incisors and upper second pre-molars, respectively. For each thickness, the 10% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gel was applied for 3x 15 min, 1x 15 min or 1x 5 min. A gel with 35% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> applied for 3x 15 min was used as positive control (PC) and no treatment was performed in negative control (NC). Odontoblast-like MDPC-23 cells were exposed for 1 h to the trans-enamel and trans-dental components collected immediately after bleaching. Cell viability, oxidative stress and mineralized nodule deposition were assessed as well as the quantification of

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> diffused through the discs. **Results:** The 10% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gel did not promote significant reduction on cell viability in comparison to NC for all tested protocols and thicknesses, resulting in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> diffusion values significantly lower than PC. Only the protocol 10% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3x 15 min applied onto discs simulating incisors increased significantly the oxidative stress and reduced mineralized nodule deposition compared to NC; however, these effects were significantly lower than PC. **Conclusion:** According to the methodology employed in this laboratorial study, the application of a bleaching gel with 10% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 5-45 min onto dental structure featured limited cytotoxicity to pulp cells, disregarding the enamel/dentin thicknesses.

**KEYWORDS:** Odontoblasts. Tooth bleaching. Cytotoxicity.

## AUTOR PARA CORRESPONDÊNCIA

Prof. Dr. Carlos Alberto de Souza Costa  
Departamento de Fisiologia e Patologia  
Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP

Rua Humaitá, 1680 - Centro. CEP: 14801-903, Araraquara, SP, Brasil  
Tel: +55-16-3301-6477. Fax: 55-16-3301-6488.  
E-mail: casouzac@foar.unesp.br