

Efeito Citotóxico de Agentes Clareadores a Base de Peróxido de Hidrogênio a 20% e 38% sobre Células Odontoblastóides

Cytotoxic effect of a 20% and a 38% hydrogen peroxide bleaching agents on odontoblast-like cells

Nancy T. SACONO¹, Cármen R. COLDEBELLA¹, Ana P. D. RIBEIRO², Diana G. S. SOARES³, Flávia Z. TRINDADE⁴, Josimeri HEBLING⁵, Carlos A. S. COSTA⁶

1 - Pós-Graduanda (doutorado) do Departamento de Clínica Infantil da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP.

2 - Pós-Graduanda (doutorado) do Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP.

3 - Pós-Graduanda (mestrado) do Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP.

4 - Pós-Graduanda (doutorado) do Departamento de Odontologia Restauradora da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP.

5 - Professora Adjunta do Departamento de Clínica Infantil da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP.

6 - Professor Adjunto do Departamento de Fisiologia e Patologia da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP.

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar a citotoxicidade de diferentes técnicas de clareamento dentário, utilizando agentes clareadores com 20% e 38% de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) sobre células odontoblastóides MDPC-23. Sessenta discos de esmalte/dentina foram adaptados em câmaras pulpares artificiais e divididos em seis grupos de acordo com o tratamento realizado sobre a superfície do esmalte: G1- 20% H_2O_2 (1 aplicação); G2- 20% H_2O_2 (2 aplicações); G3- 38% H_2O_2 (1 aplicação); G4- 38% H_2O_2 (2 aplicações); G5- 38% H_2O_2 (3 aplicações) e G6- controle. Em cada aplicação, os agentes clareadores com 20% ou 38% de H_2O_2 permaneceram sobre o esmalte por 45 ou 10 minutos, respectivamente. Após a última aplicação do gel, o meio de cultura em contato com a dentina foi obtido (extrato) e aplicado sobre as células previamente cultivadas

(30.000 células/cm²). Foram realizadas avaliações do metabolismo (Teste de MTT) e da morfologia celular (MEV). A redução do metabolismo celular foi de 96,29%; 96,11%; 96,42%; 95,62% e 97,18% para G1, G2, G3, G4 e G5, respectivamente. Houve diferença estatisticamente significativa apenas quando se comparou os grupos tratados com o grupo controle (G6) (Mann Whitney, $p < 0,05$). Nestes grupos tratados, as poucas células que sobreviveram aos extratos apresentavam notáveis alterações morfológicas. Concluiu-se que ambas as técnicas de clareamento avaliadas resultaram em intenso efeito citotóxico trans-amelodentinário para as células MDPC-23.

PALAVRAS-CHAVE: Clareamento de dente, peróxido de hidrogênio, odontoblastos.

INTRODUÇÃO

Atualmente, a sociedade moderna dita normas de padrão de beleza que são seguidas por milhares de pessoas. A busca pelo sorriso perfeito e por dentes cada vez mais brancos se tornou muito comum e por essa razão o clareamento dentário é um dos procedimentos estéticos mais procurados nos consultórios odontológicos.

Existem duas técnicas de clareamento dentário, a técnica de consultório e a técnica caseira. A técnica de consultório emprega o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em altas concentrações (20-38%) associado ou não a fontes de luz, sendo que a técnica caseira utiliza o peróxido de carbamida (10-22%) associado a moldeiras de acetato¹. Entretanto, o componente químico ativo básico de ambos os tipos de agentes clareadores utilizados clinicamente é o H_2O_2 , uma espécie reativa derivada do oxigênio. Devido a sua alta reatividade, o H_2O_2 atua na quebra das duplas ligações de moléculas orgânicas, como os pigmentos presentes na estrutura dentária. Com a quebra dessas ligações, essas moléculas se tornam menores, reduzindo a absorção de luz pelos cromóforos, promovendo, dessa maneira, o clareamento do dente².

Para ocorrer esse efeito clareador o H_2O_2 penetra pelo esmalte e alcança a dentina, agindo nos cromóforos presentes nessa estrutura³. Todavia, pelo seu baixo peso molecular, o H_2O_2 pode atravessar a espessura total do dente (esmalte e dentina) chegando a alcançar o tecido pulpar. Diversos estudos *in vitro* têm comprovado essa penetração do H_2O_2 no interior da câmara pulpar⁴⁻⁶, que é influenciada por vários fatores tais como tempo de aplicação e pressão osmótica do gel⁷, concentração do produto utilizado⁸ e o número de sessões necessárias para atingir o nível de clareamento desejado¹. Assim, uma vez no interior da polpa, o H_2O_2 pode ocasionar estresse oxidativo, gerando alterações celulares tais como danos ao DNA das células, fragmentação de proteínas e peroxidação de lipídeos, podendo induzir apoptose e necrose celular⁹.

Algumas pesquisas de citotoxicidade comprovaram o efeito danoso de agentes clareadores quando aplicados sobre células de polpa de rato^{10,11} e fibroblastos⁷. Pesquisas mais recentes, utilizando células odontoblastóides, demonstraram os efeitos tóxicos causados por aplicações consecutivas de gel clareador com 35% de H_2O_2 ¹²⁻¹⁴. Desta maneira, devido à toxicidade comprovada do H_2O_2 e da influência direta da concentração e do tempo de aplicação dos agentes clareadores sobre a penetração dos

mesmos em direção à polpa, o objetivo deste estudo foi avaliar a citotoxicidade de géis clareadores com 20% e 38% de peróxido de hidrogênio sobre células odontoblastóides MDPC-23, variando-se o número de aplicações e o tempo de contato dos géis com o esmalte.

MATERIAL E MÉTODO

Obtenção dos discos

Sessenta incisivos centrais permanentes bovinos foram obtidos, sendo que restos de tecido periodontal e outros resíduos foram removidos mecanicamente de sua superfície. Um fragmento retangular envolvendo esmalte e dentina foi obtido a partir da face vestibular de cada dente com auxílio de uma cortadeira metalográfica (ISOMET 1000, Buehler Ltda., Lake Bluf, IL, EUA). Em seguida, os espécimes foram arredondados com auxílio de ponta diamantada cilíndrica (n°1095 KG Sorensen, Barueri, SP, Brasil), em alta rotação até que se obtivessem discos de 5,2 mm de diâmetro. A superfície dentinária foi regularizada através de desgastes com lixas d'água de granulação 400 e 600 (T469-SF- Noton, Saint-Gobam Abrasivos Ltda., Jundiaí, SP, Brasil) até que o disco apresentasse espessura padronizada de 3,5 mm, determinada através de paquímetro digital (Modelo 500-144B, Mitutoyo Sul América Ltda., SP, Brasil). Em seguida, a smear-layer presente sobre a dentina foi removida por meio de aplicação de solução de EDTA 0,5 M, pH 7,2 por 30 segundos¹⁵, seguido de lavagem com água deionizada.

Câmara Pulpar Artificial (CPA)

Os discos de esmalte/dentina obtidos foram individualmente adaptados em câmaras pulpares artificiais (CPAs). Dois anéis de silicone (Rodimar rolamentos Ltda – Araraquara, SP, Brasil) com diâmetro interno de 4,47 mm e espessura de 1,78 mm, foram utilizados para manter os discos de esmalte/dentina em posição nas CPAs. Em seguida, as CPAs com os discos de esmalte/dentina adaptados foram autoclavadas (120°C por 20 minutos).

Cultivo das células MDPC-23

Células imortalizadas de linhagem odontoblástica MDPC-23 foram cultivadas em garrafas plásticas de 75 cm² (Costar Corp., Cambridge, MA, EUA) em meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, SIGMA Chemical Co., St. Louis, MO, EUA) contendo 10% de soro fetal bovino (SFB, GIBCO, Grand Island, NY, EUA), 100 IU/mL e 100 mg/mL, respectivamente, de penicilina e estreptomicina e 2 mmol/L de glutamina (GIBCO, Grand Island, NY, EUA) em uma atmosfera umedecida à 37°C, com 5% de CO₂ e 95% de ar.

Para a realização do teste de citotoxicidade, 30.000 células/cm² foram semeadas em 60 compartimentos de placas acrílicas esterilizadas de 24 compartimentos (Costar Corp., Cambridge, MA, EUA). Em seguida, as placas com as células foram armazenadas por 48 horas em incubadora na temperatura de 37°C com 5% de CO₂ e 95% de ar.

Procedimento Clareador

Na presente pesquisa, foram avaliados dois agentes clareadores,

sendo um com 20% de H₂O₂ (Whiteness HP Blue, FGM Produtos Odontológicos Ltda, SC, Brasil) e outro com 38% de H₂O₂ (Opalescence Xtra Boost, Ultradent, South Jordan, EUA) na sua composição. Para a realização do procedimento clareador, as CPAs com os discos de esmalte/dentina em posição foram colocadas individualmente nos compartimentos de placas acrílicas esterilizadas de 24 compartimentos, os quais continham 1 mL de meio de cultura completo. Assim, a superfície de esmalte dos discos permaneceu voltada para cima, de tal maneira a permitir a aplicação do gel clareador. Das 60 CPAs montadas, 50 receberam os seguintes tratamentos da superfície de esmalte (n=10): G1- 20% H₂O₂ (1 aplicação); G2- 20% H₂O₂ (2 aplicações); G3- 38% H₂O₂ (1 aplicação); G4- 38% H₂O₂ (2 aplicações) e G5- 38% H₂O₂ (3 aplicações). Como controle do experimento, a superfície de esmalte dos discos montados nas demais CPAs não recebeu qualquer tratamento (G6). Em cada aplicação, os agentes clareadores com 20% ou 38% de H₂O₂ permaneceram sobre o esmalte por 45 ou 10 minutos, respectivamente.

Obtenção dos Extratos

Após a última aplicação de cada gel clareador, este foi removido por sucção e a superfície do esmalte foi lavada com 1 mL de água deionizada autoclavada com sucção concomitante. Em seguida as CPAs com os discos em posição foram colocadas por 12 horas em incubadora de CO₂ na temperatura de 37°C. Decorrido este período, o meio de cultura de cada compartimento, o qual esteve em contato com a superfície de dentina do disco, foi recolhido, passando agora a ser denominado de extrato.

O extrato, caracterizado por meio de cultura completo e componentes do gel clareador que se difundiram através do disco de esmalte/dentina, foi aplicado sobre as células MDPC-23 previamente cultivadas em placas de 24 compartimentos. A identificação dos grupos experimentais e controle, de acordo com o número de amostras, estão demonstrados na Tabela 1. O extrato permaneceu em contato com as células pelo tempo adicional de 24 horas em incubadora, na temperatura de 37°C com 5% de CO₂ e 95% de ar.

Tabela 1. Identificação dos grupos experimentais e controle

Grupos	n° espécimes	Extratos obtidos a partir de
G1	10	H ₂ O ₂ a 20% (1 aplicação)
G2	10	H ₂ O ₂ a 20% (2 aplicações)
G3	10	H ₂ O ₂ a 38% (1 aplicação)
G4	10	H ₂ O ₂ a 38% (2 aplicações)
G5	10	H ₂ O ₂ a 38% (3 aplicações)
G6	10	Controle

Avaliação do metabolismo celular (Teste de MTT)

Do total de 10 compartimentos utilizados para cada um dos grupos experimentais e controle, oito foram utilizados para avaliação do metabolismo celular, por meio da demonstração citotóxica da desidrogenase succínica (SDH), que representa a taxa de respiração mitocondrial das células¹⁶. Esta avaliação foi reali-

zada por meio da aplicação do método colorimétrico do metilte-trazolium (Teste de MTT). Para isto, os extratos foram aspirados e sobre as células aplicou-se 900 μ L de meio de cultura (DMEM) associado a 100 μ L de solução de MTT (5 mg/mL do sal metilte-trazolium em PBS). Após o período de incubação de 4 horas, a solução de MTT foi aspirada cuidadosamente e substituída por 600 μ L da solução de isopropanol acidificada (0,04 N de HCl). Em seguida, três alíquotas de 100 μ L de cada compartimento foram transferidas para placas de 96 compartimentos. A viabilidade celular foi avaliada de maneira proporcional à absorbância determinada em 570 nm em leitor de ELISA (BIO-RAD, modelo 3550-UV, microplate reader, Hercules, Califórnia, EUA). Os dados numéricos obtidos pelo testes de MTT foram submetidos à análise estatística de Kruskal-Wallis, complementado pelo teste comparativo de Mann-Whitney. Todos os testes estatísticos foram analisados considerando o nível de significância de 5%.

Análise em microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Dois compartimentos representativos de cada grupo foram destinados à avaliação da morfologia das células em microscopia eletrônica de varredura (MEV). Para isto, lamínulas de vidro esterilizadas com 12 mm de diâmetro foram posicionadas em placas de 24 compartimentos imediatamente antes do cultivo das células¹⁷. Após o período de incubação das células em contato com os extratos, estes foram aspirados e as células MDPC-23 que permaneceram aderidas às lamínulas de vidro foram, então, fixadas por uma hora em 1 mL de glutaraldeído 2,5% tamponado. Em seguida, estas células foram submetidas a lavagem por três vezes com 1 mL de PBS (5 minutos cada lavagem), pós-fixação em tetróxido de ósmio a 1% por 60 minutos, sendo então processadas para avaliação em microscópio eletrônico de varredura (JEOL-JMS-T33A Scanning Microscope, EUA).

RESULTADOS

Metabolismo celular

Dados relativos à viabilidade celular, quantificados a partir da análise do metabolismo celular (Teste de MTT) após a aplicação do extrato sobre as células estão demonstrados na Figura 1.

Considerando o grupo controle (G6) como 100% de metabolismo celular, a redução percentual do metabolismo das células MDPC-23 observada para os grupos G1, G2, G3, G4 e G5 foi de 96,29%, 96,11%, 96,42%, 95,62% e 97,18%, respectivamente. Houve diferença estatisticamente significativa quando se comparou todos os grupos tratados com o grupo controle (Mann-Whitney, $p < 0,05$). Quando se comparou os grupos que receberam o gel clareador entre si, a grande redução do metabolismo celular não diferiu estatisticamente, independente da concentração de peróxido de hidrogênio e do número de aplicações do gel clareador. Somente uma aplicação do gel clareador, de ambas as concentrações, foi suficiente para causar redução de mais de 95% do metabolismo das células.

Morfologia celular (MEV)

Nos grupos tratados com peróxido de hidrogênio a 20% muitas células que estavam aderidas ao substrato morreram, devido

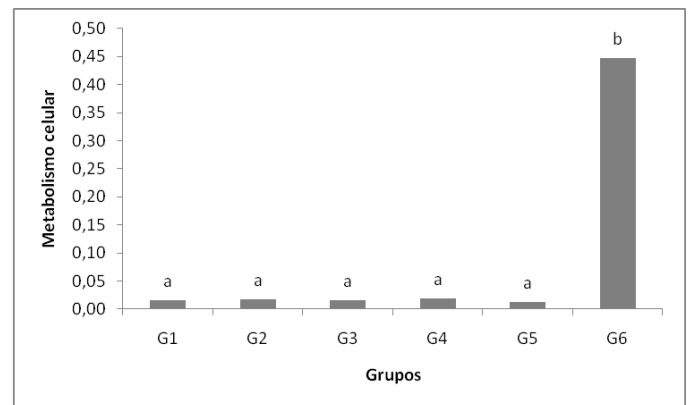


Figura 1- Representação gráfica dos valores do metabolismo celular (MTT). Barras representam médias (n=8) sendo que as designadas com letras iguais indicam ausência de diferença estatística entre os grupos (Mann-Whitney; $p > 0,05$).

ao procedimento clareador, e se desprenderam da lamínula de vidro. As poucas células restantes apresentaram-se ainda com morfologia dentro do normal com prolongamentos citoplasmáticos originados de sua membrana (Figura 2A). Os mesmos aspectos foram observados quando o agente clareador foi aplicado por duas vezes consecutivas (Figura 2B).

Nos grupos tratados com peróxido de hidrogênio a 38% também foi observado um reduzido número de células que permaneceram aderidas ao substrato de vidro. Entretanto, ocorreram importantes alterações morfológicas nas células, as quais se apresentavam arredondadas e com poucos prolongamentos citoplasmáticos finos e curtos. Fragmentos de membrana citoplasmática de células letalmente agredidas foram observados sobre as lamínulas de vidro (Figuras 2C, 2D e 2E). Independente do número de aplicações do agente clareador, os efeitos sobre as células foram semelhantes para os grupos G3, G4 e G5.

No grupo controle observa-se um grande número de células recobrando, através de seu amplo citoplasma, toda a superfície do substrato de vidro. Estas células pulpares estão em confluência, sendo observada mitose celular (Figura 2F).

DISCUSSÃO

Durante o procedimento clínico de clareamento dentário, tem sido demonstrado que a aplicação do gel clareador sobre o esmalte pode resultar na formação de porosidades devido à dissolução da matriz deste tecido altamente mineralizado², aumentando sua permeabilidade¹⁸. Tais porosidades podem propiciar uma maior penetração de H_2O_2 e componentes derivados dos agentes clareadores em direção à polpa. Diversas pesquisas *in vitro* comprovam que o H_2O_2 presente nos agentes clareadores, mesmo em baixas concentrações, atravessa facilmente o esmalte e dentina para alcançar a câmara pulpar^{5,7,18,19}. Quando em contato com o tecido pulpar o H_2O_2 e os produtos resultantes de sua degradação, tais como íons hidroxila (OH) e outras espécies reativas, podem causar peroxidação lipídica e fragmentação de proteínas com conseqüente lesão da membrana celular⁹, gerando morte celular por apoptose ou necrose^{11,20}.

Benetti *et al.*⁴, em 2004, avaliaram a capacidade de difusão *in*

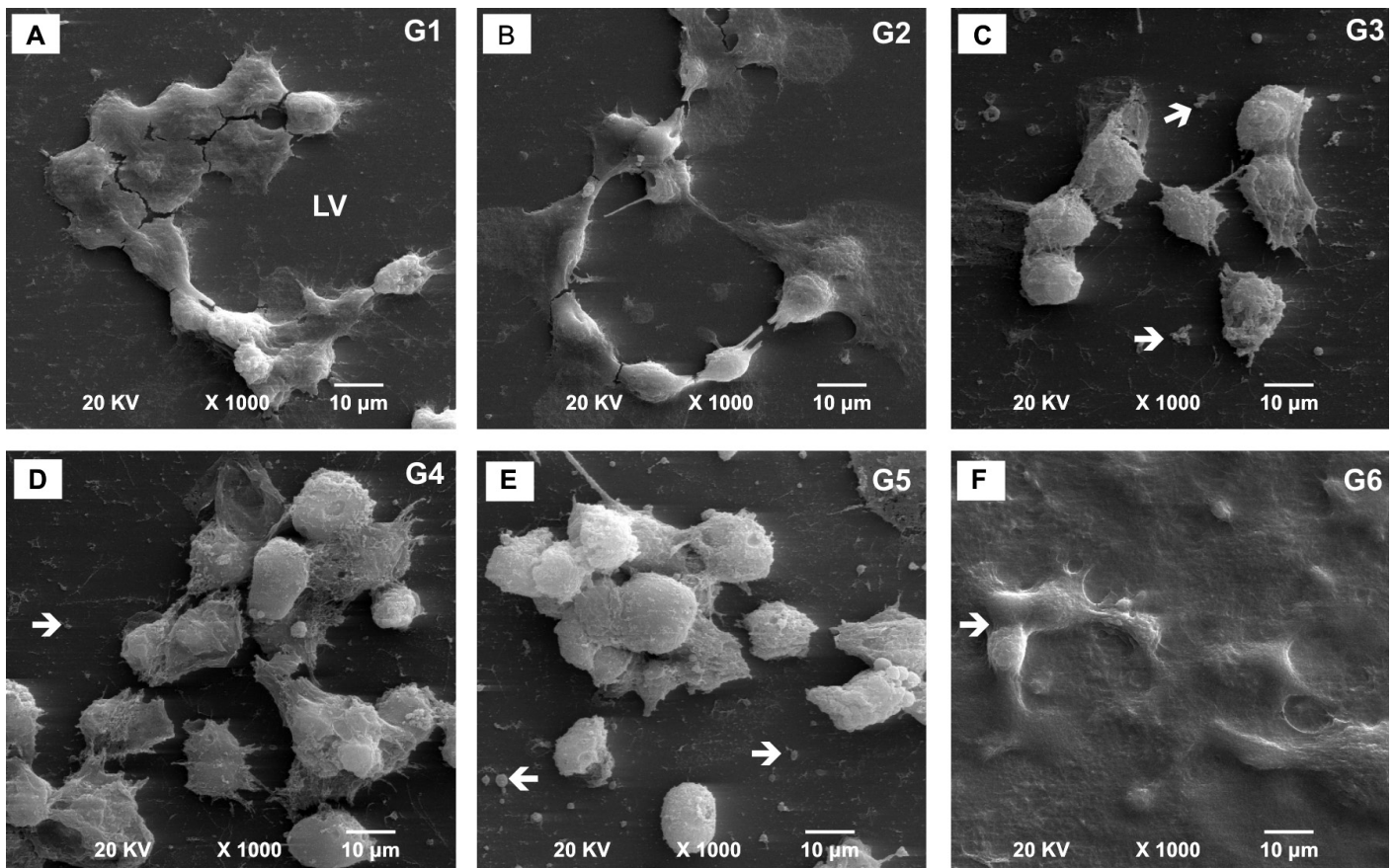


Figura 2- Fotomicrografias representativas da morfologia celular de cada grupo. **A-** H_2O_2 a 20% (1 aplicação): Muitas células que estavam aderidas ao substrato morreram e se deslocaram da lamínula de vidro (LV). As poucas células com notável contração do citoplasma que permaneceram na região apresentam-se ainda com alguns prolongamentos citoplasmáticos originados de sua membrana, os quais parecem aderí-las ao substrato. **B-** H_2O_2 a 20% (2 aplicações): Grande diminuição do número de células aderidas ao substrato de vidro, exibindo forma mais arredondada e com perda total ou manutenção de poucos prolongamentos citoplasmáticos. **C, D, E-** H_2O_2 a 38% (1 aplicação, 2 aplicações e 3 aplicações, respectivamente): Independente do número de aplicações do agente clareador, os efeitos sobre as células foram semelhantes para os grupos G3, G4 e G5. O reduzido número de células MDPC-23 que permaneceram aderidas ao substrato de vidro exibe morfologia arredondada com poucos prolongamentos citoplasmáticos. Os restos de membrana citoplasmática das células que foram letalmente agredidas podem ser claramente observados sobre o substrato (→). **F- controle:** Um grande número de células MDPC-23 pode ser observado cobrindo, através de seu amplo citoplasma, toda a superfície do substrato de vidro. Estas células pulparestão em confluência, sendo observada mitose celular (→).

in vitro do H_2O_2 através dos tecidos duros de dentes bovinos, utilizando géis clareadores com 35% de H_2O_2 na sua composição. Os autores demonstraram que uma elevada concentração de H_2O_2 se difundiu através do esmalte e da dentina em direção ao espaço pulpar. Entretanto, o trabalho não determinou se os elevados níveis de H_2O_2 detectados no interior das câmaras pulpares influenciaram, de maneira significativa, a toxicidade da técnica de clareamento. Para elucidar tal questão, pesquisas de citotoxicidade, também utilizando incisivos bovinos, foram realizadas aplicando-se peróxido de hidrogênio a 35% sobre discos envolvendo esmalte e dentina¹²⁻¹⁴. Os autores constataram que componentes do agente clareador foram capazes de atravessar a estrutura dentária e causar intensos efeitos tóxicos sobre as células pulpares MDPC-23. Estes autores demonstraram ainda que o número de aplicação do gel clareador sobre o esmalte está diretamente relacionado com a intensidade dos efeitos tóxicos dos produtos para as células pulpares, sendo que este dado torna preocupante o uso indiscriminado do clareamento dentário. Semelhante metodologia também foi utilizada na presente pesquisa, onde foram utilizados discos de esmalte/dentina, obtidos a partir de dentes bovinos, os quais foram adaptados em câmaras pulpares artificiais. Atualmente, dentes bovinos têm sido am-

plamente utilizados em pesquisas *in vitro*²¹⁻²², por apresentarem características semelhantes aos dentes humanos, como número e diâmetro dos túbulos dentinários e radiopacidade do esmalte e dentina^{4,6}. É importante ressaltar também que a espessura dos discos de esmalte/dentina utilizados na presente pesquisa foi de 3,5 mm (1,3 mm de esmalte e 2,2 mm de dentina), semelhante àquela descrita por Sulieman *et al.*³ (2005) para dentes humanos (de 0,9 a 1,05 mm de esmalte e 2,33 mm de dentina). Dessa maneira, procurou-se simular, na presente pesquisa *in vitro*, uma situação *in vivo* semelhante àquelas onde agentes clareadores são aplicados sobre os dentes com o objetivo principal de clareá-los.

Outros fatores relacionados à difusão do agente clareador são: 1) o tempo de contato com o substrato dentário e 2) a concentração do gel utilizado. Tais fatores podem influenciar diretamente a toxicidade do procedimento clareador. Por esse motivo o objetivo do presente trabalho foi comparar a citotoxicidade de duas técnicas de clareamento de consultório empregando diferentes concentrações de H_2O_2 (20% e 38%) com diferentes tempos de aplicação. Os agentes clareadores utilizados estão disponíveis no mercado e foram manipulados de acordo com as orientações do fabricante. Assim, foi demonstrado que para todos os grupos experimentais, onde os agentes clareadores foram aplicados

sobre a superfície do esmalte, ocorreu mais de 96% de redução do metabolismo celular, em média, independente da concentração de H_2O_2 utilizado e do seu tempo de aplicação (Figura 1). Entretanto, a avaliação em microscopia de varredura demonstrou um efeito mais agressivo quando se utilizou o agente clareador de maior concentração, apesar de apresentarem redução do número de células de forma semelhante. As poucas células que permaneceram aderidas ao substrato de vidro após o clareamento com H_2O_2 a 20% apresentavam-se ainda com morfologia dentro do normal (Figuras 2A e 2B), apesar da drástica redução de seu metabolismo. Por outro lado, nos grupos tratados com H_2O_2 a 38% ocorreram alterações morfológicas importantes nas células, as quais se apresentavam arredondadas e com pouco ou nenhum prolongamento citoplasmático (Figuras 2C, 2D e 2D).

Diversas pesquisas demonstram que quanto maior a concentração de H_2O_2 no gel clareador maiores são as alterações em esmalte, o que promove maior difusão de espécies reativas de oxigênio para a polpa^{2,18}. Portanto, no presente estudo, esperava-se que a citotoxicidade do procedimento clareador utilizando-se um gel com 38% de H_2O_2 fosse maior quando comparado aos grupos nos quais a concentração de 20% de H_2O_2 foi empregada. Entretanto, não foi observada diferença significativa de citotoxicidade entre as técnicas. Tal fato pode ser explicado pela diferença no tempo de aplicação de cada gel. O agente clareador com 20% de H_2O_2 permaneceu em contato com a superfície de esmalte durante 45 minutos em cada aplicação, enquanto que o gel clareador com 38% de H_2O_2 permaneceu somente por 10 minutos, em cada aplicação. Esta variação do tempo de aplicação dos géis sobre o esmalte foi realizada na presente pesquisa devido às necessidades de seguir a recomendações de cada fabricante para a aplicação clínica de seus produtos. O fabricante do Whiteness HP Blue (20% de H_2O_2) relata que a técnica de clareamento dentário empregando seu agente clareador é mais segura e conservadora devido, exclusivamente, a uma baixa concentração de H_2O_2 incorporada na composição química do produto. Entretanto, um estudo *in vitro*, realizado por Sulieman *et al.*²³ (2004), observou que géis clareadores contendo baixas concentrações de H_2O_2 necessitaram de mais tempo e maior número de aplicações sobre o esmalte para se obter um clareamento dentário uniforme. Desta forma, para compensar a baixa concentração de H_2O_2 , o fabricante do agente clareador com 20% de H_2O_2 aumentou o tempo de aplicação de seu produto sobre o esmalte com o intuito de melhorar os resultados clínicos. Todavia, de acordo com os dados científicos obtidos na presente pesquisa, essa compensação implicou em aumento da toxicidade da técnica, tornando-a tão tóxica quanto o procedimento clareador utilizando 38% de H_2O_2 .

De acordo com o fabricante do Opalescence Xtra Boost (38% de H_2O_2), este produto apresenta na sua composição química, catalisadores químicos (boosters ou ativadores) para melhorar a qualidade do tratamento clareador. Esses catalisadores, quando misturados ao H_2O_2 são responsáveis por elevar o pH da mistura e, assim, aumentar a decomposição do H_2O_2 , produzindo mais espécies reativas de oxigênio. A decomposição do H_2O_2 é reduzida em meio ácido, tornando-o mais estável para o armazenamento¹. Portanto, esta incorporação de catalisador ao H_2O_2 é realizada imediatamente antes da aplicação clínica do pro-

duto, através da mistura dos componentes presentes em cada seringa. Entretanto, a geração de EROs em maior quantidade pode tornar o gel clareador mais tóxico. Trindade *et al.*¹⁴, em 2009, demonstraram que a utilização de agente clareador com 35% de H_2O_2 reduziu o metabolismo de células odontoblastóides MDPC-23 em 92% após 3 aplicações do produto, com um tempo de contato de 15 minutos em cada aplicação. Na presente pesquisa, 3 aplicações do gel clareador com 38% de H_2O_2 causaram uma redução ainda maior do metabolismo celular (97%), mesmo o gel clareador tendo sido mantido por um tempo menor sobre a superfície de esmalte (10 minutos). Estes dados comparativos demonstram que a concentração de H_2O_2 no produto e a incorporação de ativadores estão diretamente relacionadas à toxicidade do procedimento.

Na presente pesquisa não foi utilizada qualquer tipo de fonte de luz associada ao procedimento clareador, pois ambos os fabricantes (FGM e Ultradent) não recomendam a utilização de fontes de luz e/ou calor durante as técnicas de clareamento dentário. Tem sido descrito que a luz tem um efeito catalisador, pois acelera a liberação de radicais hidroxilas ($OH\cdot$) a partir do H_2O_2 . Quando a luz é aplicada sobre o gel clareador, uma parte dela é absorvida e sua energia é convertida em calor, o qual é utilizado para quebrar o H_2O_2 e liberar os radicais $OH\cdot$ para interagir com moléculas mais complexas e degradá-las no interior do tecido dentário¹. Todavia, a aplicação de luz pode gerar tanto um aumento de temperatura²⁴ quanto uma maior difusão do agente clareador e/ou seus produtos através dos tecidos duros do dente para o interior da câmara pulpar²⁵, podendo tornar o procedimento clareador mais tóxico para a polpa. Dias Ribeiro *et al.*¹³, em 2009, demonstraram que a aplicação de luz halógena tornou a técnica de clareamento dentário com 35% de H_2O_2 mais tóxica para as células pulpares. Além disso, pesquisas recentes fornecem evidências de que a catalisação dos géis clareadores por meio da utilização de fontes de luz não é necessária para se obter melhores resultados estéticos, ou seja, a aplicação da luz não traz contribuição comprovada no resultado final do clareamento dentário²⁶⁻²⁸ e ainda pode causar danos ao tecido pulpar¹.

Tem sido observado que os dados obtidos a partir dos estudos *in vitro* nem sempre correspondem ao que é visto *in vivo*, devido à dificuldade de simular, em nível laboratorial, todas as condições fisiológicas do complexo dentino-pulpar. A pressão de exsudação do fluido dentinário, bem como a presença de prolongamentos citoplasmáticos e outros componentes intratubulares nos dentes vitais²⁹ podem diminuir a difusão de componentes do gel clareador através dos túbulos dentinários. Além disso, a polpa dentária apresenta um sistema de vasos linfáticos que participa da eliminação de produtos externos que alcançam este tecido conjuntivo especializado. Outro fator importante é a presença de enzimas anti-oxidantes como a catalase, superóxido dismutase, peroxidases além das vitaminas A e E e do ácido ascórbico que atuam na degradação enzimática do H_2O_2 ³⁰⁻³¹. Poucos estudos *in vivo* avaliaram a resposta pulpar frente aos diversos tipos de clareamento disponíveis. Seale e Wilson³² (1985) avaliaram a resposta pulpar de dentes clareados com gel contendo H_2O_2 a 35%. Os autores constataram resposta inflamatória pulpar considerável, porém a pesquisa foi realizada em dentes de cães, podendo haver variação com relação à espessura de es-

malte/dentina quando comparado a dentes humanos. Pesquisas realizadas em dentes humanos posteriores demonstraram que agentes clareadores contendo 35% e 38% de H_2O_2 não causaram dano pulpar significativo³³⁻³⁴. Entretanto, numa pesquisa recente, onde um gel clareador com 38% foi aplicado sobre o esmalte de dentes anteriores, foi relatada a ocorrência de ampla área de necrose pulpar associada à calcificação distrófica parcial da polpa³⁵. Os autores descreveram que o procedimento clínico de clarear dentes anteriores (incisivos) em consultório, utilizando géis com alta concentração de H_2O_2 , pode causar não apenas danos pulpares, mas também dor pós-operatória. Este estudo pioneiro foi o primeiro realizado com incisivos humanos, pois até o momento, só haviam sido publicadas investigações avaliando os efeitos dos agentes clareadores em dentes posteriores, especialmente pré-molares, os quais apresentam maior espessura de esmalte e dentina. Assim, esta maior espessura dos tecidos duros dos dentes posteriores quando comparado aos anteriores poderia mascarar os efeitos tóxicos dos procedimentos clareadores, já que o foco principal do clareamento dentário está centrado nos dentes anteriores, os quais possuem reduzida espessura de esmalte/dentina. Portanto, a literatura comprova, tanto com trabalhos *in vitro* quanto *in vivo*, que os procedimentos de clareamento dentário podem resultar em efeitos tóxicos para as células e tecido pulpar como um todo, o que causaria desde processos inflamatórios discretos e reversíveis até necrose da polpa. As alterações promovidas pelos agentes clareadores são dependentes de vários fatores, tais como o tipo e a concentração dos géis clareadores, o tempo e o número de aplicações do gel, a associação de fontes de luz e/ou calor e as diferenças morfológicas inerentes aos dentes a serem clareados. Diante das variáveis que influenciam a toxicidade das técnicas de clareamento dentário, novas pesquisas deverão ser desenvolvidas com o objetivo de determinar combinações ideais destes fatores para modificar as técnicas de clareamento dentário existentes atualmente, tornando-as mais seguras e eficazes. Ainda, futuros estudos deverão ser conduzidos para elucidar os mecanismos celulares envolvidos no processo de clareamento dentário, o que permitirá eliminar ou mesmo minimizar os efeitos de agressão pulpar de tal procedimento clínico.

CONCLUSÃO

Dentro das condições experimentais da presente pesquisa, foi possível concluir que ambas as técnicas de clareamento avaliadas resultaram em intenso efeito citotóxico trans-amelodentinário para as células MDPC-23, independente da concentração e do número de aplicações do gel clareador.

REFERÊNCIAS

01. Buchalla W, Attin T. External bleaching therapy with activation by heat, light or laser--a systematic review. *Dent Mater.* 2007; 23(5): 586-96.
02. Kwon YH, Huo MS, Kim KH, Kim SK, Kim YJ. Effects of hydrogen peroxide on the light reflectance and morphology of bovine enamel. *J Oral Rehabil.* 2002; 29 (5): 473-7.
03. Suliman M, Addy M, Rees JS. Surface and intra-pulpal temperature

- rises during tooth bleaching: an in vitro study. *Br Dent J.* 2005; 199(1): 37-40.
04. Benetti AR, Valera MC, Mancini MNG, Miranda CB, Baldicci I. In vitro penetration of bleaching agents into the pulp chamber. *Int Endod J.* 2004; 37(2): 120-4.
05. Gökay O, Müjdeci A, Algin E. Peroxide penetration into the pulp from whitening strips. *J Endod.* 2004; 30(12): 887-9.
06. 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(9): 1074-7.
07. Hanks CT, Fat JC, Wataha JC, Corcoran JF. Cytotoxicity and dentin permeability of carbamide peroxide and hydrogen-peroxide vital bleaching materials, in vitro. *J Dent Res.* 1993; 72(5): 931-8.
08. Gökay O, Tuncbilek M, Ertan R. Penetration of the pulp chamber by carbamide peroxide bleaching agents on teeth restored with a composite resin. *J Oral Rehabil.* 2000a; 27(5): 428-31.
09. Martindale JL, Holbrook NJ. Cellular Response to Oxidative Stress: Signaling for Suicide and Survival. *J Cell Physiol.* 2002; 192(1): 1-15.
10. Lee DH, Lim B-S, Lee Y-K, Yang H-C. Effects of hydrogen peroxide (H_2O_2) on alkaline phosphatase activity and matrix mineralization of odontoblast and osteoblast cell lines. *Cell Biol Toxicol.* 2006; 22(1): 39-46.
11. Fukuyama Y, Ohta K, Okoshi R, Kizaki H, Nakagawa K. Hydrogen peroxide induces expression and activation of AMP-activated protein kinase in a dental pulp cell line. *Int End J.* 2008; 41(3): 197-203.
12. Coldebella CR, Ribeiro AP, Sacono NT, Trindade FZ, Hebling J, Costa CA. Indirect cytotoxicity of a 35% hydrogen peroxide bleaching gel on cultured odontoblast-like cells. *Braz Dent J.* 2009; 20(4): 267-74.
13. Dias Ribeiro AP, Sacono NT, Lessa FC, Nogueira I, Coldebella CR, Hebling J, de Souza Costa CA. 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(3): 458-64.
14. Trindade FZ, Ribeiro AP, Sacono NT, Oliveira CF, Lessa FC, Hebling J, Costa CA. Trans-enamel and trans-dentinal cytotoxic effects of a 35% H_2O_2 bleaching gel on cultured odontoblast cell lines after consecutive applications. *Int Endod J.* 2009; 42(6): 516-24.
15. Jacques P, Hebling J. Effect of dentin conditioners on the microtensile bond strength of a conventional and a self-etching primer adhesive system. *Dent Mater.* 2005; 21(2): 103-9.
16. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 1983; 65(1-2): 55-63.
17. Mendonça AAM, Souza PP, Hebling J, Costa CA. Cytotoxic effects of hard-setting cements applied on the odontoblast cell line MDPC-23. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2007; 104(4): 102-8.
18. Schiavoni RJ, Turssi CP, Rodrigues Jr AL, Serra MC, Pécora, JD, Fröner IC. Effect of bleaching agents on enamel permeability. *Am J Dent.* 2006; 19(5): 313-16.
19. Gökay O, Yilmaz F, Akin S Tuncbilek M, Ertan R. Penetration of the pulp chamber by bleaching agents in teeth restored with various restorative materials. *J Endod.* 2000b; 26(2): 92-4.
20. Saito Y, Nishio K, Ogawa Y, Kimata J, Kinumi T, Yoshida Y, Noguchi N; Etsuo Niki. Turning point in apoptosis/necrosis induced by hydrogen peroxide. *Free Radical Research.* 2006; 40(6):619-30.
21. Adibfar A. et al. Leaching of hydrogen peroxide from bleached bovine enamel. *J Endod.* 1992; 18(10): 488-91.
22. Attin T, Kielbassa AM, Schwanenber M, Hellwig E. Effect of fluoride treatment on remineralization of bleached enamel. *J Oral Rehabil.* 1997; 24(4): 282-6.
23. Suliman M, Addy M, MacDonal E, Rees JS. The effect of hydrogen peroxide concentration on the outcome of tooth whitening: an in vitro study. *J Dent* 2004; 32(4): 295-9.

24. Eldeniz AU, Usumez A, Usumez S, Ozturk N. Pulpal temperature rise during light-activated bleaching. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2005; 72(2): 254-9.
25. Wetter NU, Walverde D, Kato IT, Eduardo CP. Bleaching efficacy of whitening agents activated by xenon lamp and 960-nm diode radiation. *Photomed Laser Surg*. 2004; 22(6): 489-93.
26. Hein DK, Ploeger BJ, Hartup JK, Wagstaff RS, Palmer TM, Hansen LD. In-office vital tooth bleaching - what do lights add? *Compend Contin Educ Dent*. 2003; 24(4A): 340-52.
27. Bruzell EM, Johnsen B, Aalerud TN, Dahl JE, Christensen T. In vitro efficacy and risk for adverse effects of light-assisted tooth bleaching. *Photochem Photobiol Sci*. 2009; 8(3): 377-85.
28. Lima DA, Aguiar FH, Liporoni PC, Munin E, Ambrosano GM, Lovadino JR. In vitro evaluation of the effectiveness of bleaching agents activated by different light sources. *J Prosthodont*. 2009; 18(3): 249-54.
29. Sauro S, Pashley DH, Montanari M, Chersoni S, Carvalho RM, Toledano M, Osorio R, Tay FR, Prati C. Effect of simulated pulpal pressure on dentin permeability and adhesion of self-etch adhesives. *Dent Mater*. 2007; 23(6): 705-13.
30. Bowels WH, Burns H. Catalase/peroxidase activity in dental pulp. *J Endod*. 1992; 18(11): 527-34.
31. Esposito P, Varvara G, Murmura G, Terlizzi A, Caputi S. Ability of healthy and inflamed human dental pulp to reduce hydrogen peroxide. *Eur J Oral Sci*. 2003; 111(5): 454-6.
32. Seale NS, Wilson CFG. Pulpal response of bleaching of teeth in dogs. *Pediatr Dent*. 1985; 7(3): 209-14.
33. Cohen SC, Chase C. Human pulpal response to bleaching procedures on vital teeth. *J Endod*. 1979; 5(5): 134-8.
34. Kina JF, Huck C, Riehl H, Martinez TC, Sacono NT, Ribeiro APD, Costa CAS. Response of human pulps after professionally applied vital tooth bleaching. *Int Endod J*. 2010 (In Press).
35. De Souza Costa CA, Riehl H, Kina JF, Sacono NT, Hebling J. Human pulp responses to in-office tooth bleaching. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2010 (In Press).

ABSTRACT

The aim of this *in vitro* study was to evaluate the trans-enamel and trans-dentinal cytotoxic effects of two in-office tooth bleaching techniques that employ bleaching gels containing 20% and 38% of H₂O₂ on cultured odontoblast-like cell line (MDPC-23). Sixty enamel/dentin discs were obtained from bovine central incisors and placed individually in artificial pulp chambers. Six groups were formed according to the following enamel treatments: G1- 20% H₂O₂ (1 application); G2- 20% H₂O₂ (2 applications); G3- 38% H₂O₂ (1 application); G4- 38% H₂O₂ (2 applications); G5- 38% H₂O₂ (3 applications); and G6- control (no treatment). In G1 and G2, the bleaching gel was left in contact with the enamel surface for 45 min in each application. However, in G3, G4, and G5 the bleaching gel was applied for only 10 min *per* application. After the last application, the extracts were collected and applied on previously cultured cells

(30.000 cells/cm²) for 24 h. Cell metabolism was evaluated by the MTT assay and cell morphology was analysed by scanning electron microscopy. Cell metabolism decreased by 96.29%; 96.11%; 96.42%; 95.62%; and 97.18% in G1, G2, G3, G4, and G5, respectively. All treated groups differed significantly from non-treated control group (G6) (*p* < 0.05). However, the difference in cell metabolism among treated groups was not significant statistically. In addition, significant morphological cell alterations were observed in all treated groups. Under the tested experimental conditions, the extracts collected after both tooth bleaching techniques evaluated in this study caused severe toxic effects on cultured odontoblast-like cell MDPC-23.

KEYWORDS: Tooth bleaching, hydrogen peroxide, odontoblasts.

ENDEREÇO 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
Tel: (16) 3301-6477. Fax: (16) 3301-6488
E-mail: casouzac@foar.unesp.br