

Citotoxicidade Transamelodentinária de uma Fita Clareadora com 10% de Peróxido de Hidrogênio Sobre Células de Linhagem Odontoblástica

Trans-enamel and Trans-dentinal Cytotoxicity of a 10% Hydrogen Peroxide Whitestrip on Odontoblast-like Cells

Elaine C. V. PONTES¹, Livia R. M. GOMES², Diana G. S. SOARES³, Ana P. D. RIBEIRO³, Josimeri HEBLING⁴, Carlos A. S. COSTA⁵

1. Pós-graduanda (mestrado do Programa de Pós-graduação em Reabilitação Oral). Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese. Faculdade de Odontologia de Araraquara/UNESP.

2. Cirurgiã-dentista graduada pela Faculdade de Odontologia de Araraquara/UNESP.

3. Pós-graduanda (doutorado do Programa de Pós-graduação em Reabilitação Oral). Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese. Faculdade de Odontologia de Araraquara/UNESP.

4. Profa. Adjunto da Disciplina de Odontopediatria. Departamento de Clínica Infantil. Faculdade de Odontologia de Araraquara/UNESP.

5. Prof. Titular da Disciplina de Patologia. Departamento de Fisiologia e Patologia. Faculdade de Odontologia de Araraquara/UNESP.

RESUMO

Objetivo: Avaliar a citotoxicidade trans-amelodentinária de uma fita clareadora (FC) com 10% de peróxido de hidrogênio (PH) sobre células odontoblastóides MDPC-23. **Material e Método:** Discos de esmalte/dentina adaptados em câmaras pulpares artificiais foram posicionados em compartimentos contendo meio de cultura (DMEM), sendo o esmalte submetido a 2 aplicações de 30 minutos da FC. O meio de cultura em contato com a dentina (extrato) foi aplicado sobre as células por 1 hora, durante os períodos de 1 ou 5 dias. Como controle positivo, foram realizadas 3 aplicações de 15 min de um gel clareador com 35% de PH. No grupo controle negativo, nenhum tratamento foi realizado no esmalte. Após os períodos de avaliação, as células MDPC-23 foram analisadas quanto ao metabolismo (Teste de MTT), atividade da fosfatase alcalina (ALP) (Anova e Tukey;

$\alpha=5\%$;) e danos à membrana celular (citometria de fluxo). **Resultados:** Quanto ao metabolismo e atividade de ALP, não houve diferença significativa entre os grupos clareados com a FC e o controle negativo, independente do número de aplicações do extrato sobre as células ($p>0,05$). Porém, o grupo clareado com a FC por 5 dias também não foi diferente estatisticamente do controle positivo. A análise por citometria de fluxo indicou danos à membrana celular para o grupo controle positivo. **Conclusões:** Concluiu-se que a FC com 10% de PH não causou efeito tóxico significativa para as células MDPC-23; porém, o aumento na frequência de aplicação pode vir acompanhado de maiores efeitos tóxicos para as células em cultura.

PALAVRAS-CHAVE: Clareamento dental, toxicidade, odontoblastos.

INTRODUÇÃO

A técnica do clareamento caseiro é uma modalidade de tratamento para dentes escurecidos bastante empregada nas últimas décadas, principalmente por ser considerada mais segura para o elemento dental bem como por apresentar comprovada eficácia clínica¹. Tradicionalmente, o emprego desta técnica baseia-se no uso de um gel clareador contendo 10% de peróxido de carbamida (PC), o qual é aplicado na face vestibular dos dentes a serem clareados pelo próprio paciente através do uso de moldes individualizadas. Apesar da aplicação do gel clareador ser realizada pelo paciente, todo o procedimento é realizado sob supervisão de um cirurgião-dentista, sendo, desta forma, esta técnica denominada clareamento caseiro supervisionado². Tem sido descrito que esta modalidade de clareamento dentário resulta em menor índice de sensibilidade pós-tratamento³⁻⁶, limitado efeito tóxico in vitro sobre células pulpares⁷⁻⁸, ausência ou mínimos efeitos adversos sobre o esmalte⁹⁻¹³. Além destes fato-

res positivos, tem sido demonstrado que o clareamento caseiro supervisionado também apresenta comprovada eficácia clínica associada à manutenção do clareamento a longo prazo^{3-4,14-16}.

Na atualidade, novos sistemas de clareamento caseiro têm sido propostos com o objetivo de clarear dentes manchados sem a necessidade de supervisão por um cirurgião-dentista. Estes produtos estão disponíveis diretamente ao consumidor ("over-the-counter"/OTC) em farmácias, supermercados e internet, sendo comercializados em diferentes formas de apresentação, tais como fitas clareadoras, vernizes e líquidos "para pintar" (paint-on)¹⁷. Dentre os OTCs disponíveis no mercado para o clareamento dental, as fitas clareadoras (FC) têm sido amplamente utilizadas devido à facilidade de utilização. Esses materiais são à base de um poliestireno flexível, no qual uma concentração pré-determinada (5,3 a 14%) de peróxido de hidrogênio (PH) é uniformemente aplicada na superfície aderente¹⁸, a qual deve ser aplicada diretamente sobre o esmalte da face vestibular

dos dentes a serem clareados¹⁷. Alguns estudos demonstraram que esses produtos apresentam eficácia clínica e efeitos adversos semelhantes aos observados para os géis caseiros utilizados em moldeiras¹⁹⁻²⁰.

O mecanismo proposto para o clareamento com FCs baseia-se na atividade do PH, ou seja, na ação oxidativa desta molécula sobre os cromóforos presentes na dentina, tal como anteriormente descrito para as técnicas tradicionais de clareamento dental¹. No entanto, estudos tem demonstrado que o PH proveniente de agentes clareadores apresenta capacidade de penetrar através da estrutura mineralizada do dente e atingir a câmara pulpar *in vitro*^{9,21-22}, inclusive a partir de FCs contendo concentrações de PH tão baixas quanto 5,3%²³. Além disso, outros estudos observaram que quando agentes clareadores foram aplicados na superfície de discos de esmalte/dentina, os produtos provenientes da difusão transamelodentinária foram capazes de causar danos celulares, sendo esse efeito diretamente proporcional à concentração do agente clareador empregado^{7-8,24-28}. Desta forma, como o mecanismo de ação das FCs no clareamento dental está baseado na ação oxidativa do PH, estes produtos podem apresentar os mesmos efeitos adversos observados para os demais agentes. Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar a citotoxicidade transamelodentinária de uma fita clareadora contendo 10% de PH sobre células odontoblastóides MDPC-23.

MATERIAL E MÉTODO

Obtenção dos discos de esmalte e dentina

Vinte e cinco discos de esmalte e dentina foram obtidos a partir de incisivos de novilhos com 20 a 30 meses de idade. Dentes com trincas no esmalte, cálculo no terço médio coronário, desgaste do terço incisal, alterações morfológicas da coroa e hipoplasias de esmalte foram descartados. Inicialmente, blocos de esmalte/dentina foram obtidos a partir do terço médio dos dentes com um disco diamantado dupla face (KG Sorensen, Barueri, SP, Brasil) montado em peça reta (Dabi Atlante, Ribeirão Preto, SP, Brasil) sob irrigação constante. Em seguida, os espécimes foram arredondados com auxílio de ponta diamantada cilíndrica (no 1095 KG Sorensen, Barueri, SP, Brasil), em alta rotação (Dabi Atlante, Ribeirão Preto, SP, Brasil). O diâmetro dos discos foi padronizado em 5,2 mm e a superfície de dentina foi regularizada com lixas d'água de granulação 400 e 600 (T469-SF- Noton, Saint-Gobam Abrasivos Ltda., Jundiaí, SP, Brasil), obtendo-se uma espessura de esmalte e dentina padronizada em 3,5 mm. Em seguida, a smear-layer presente sobre a dentina foi removida pela aplicação de 10 µL de solução de EDTA 0,5 M, pH 7,2 por 30 segundos, seguido de lavagem com água deionizada esterilizada.

Câmara Pulpar Artificial (CPA)

Os discos de esmalte/dentina foram adaptados em câmaras pulpares artificiais (CPAs), as quais foram empregadas em estudos anteriores^{8,24-27}. Os discos foram adaptados entre dois anéis de silicone (Rodimar Rolamentos Ltda, Araraquara, SP, Brasil) no compartimento superior do dispositivo, e uma matriz de aço de 5 mm (Injecta Produtos Odontológicos, Diadema, SP, Brasil) foi adaptada entre o anel de silicone e a parede lateral

do compartimento. As CPAs foram autoclavadas e, em seguida, foi realizado vedamento adicional com cera rosa nº 7 (Wilson®, Polidental, Cotia, SP, Brasil) na região entre o disco de esmalte/dentina e da matriz de aço.

Cultivo das células MDPC-23

Células imortalizadas de linhagem odontoblastóide MDPC-23 foram cultivadas em meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, SIGMA Chemical Co., St. Louis, MO, EUA) contendo 10% de soro fetal bovino (GIBCO, Grand Island, NY, EUA), 100 IU/mL e 100 mg/mL, respectivamente de penicilina e estreptomicina e 2 mmol/L de glutamina (GIBCO, Grand Island, NY, EUA) em uma atmosfera umedecida a 37°C contendo 5% de CO₂. Estas células foram subcultivadas a cada três dias na concentração de 30.000 células/cm², até atingir o número de células adequado para a execução do experimento. Para a realização do teste de citotoxicidade, 12.500 células/cm² foram semeadas em compartimentos de placas acrílicas de 24 compartimentos (Costar Corp., Cambridge, MA, EUA), sendo mantidas em incubadora a 37°C e 5% de CO₂ durante 72 horas.

Procedimento clareador

Em capela de fluxo laminar, as CPAs, previamente autoclavadas com os discos em posição, foram posicionadas em placas de acrílico de 24 compartimentos (Costar Corp., Cambridge, MA, EUA) contendo 1 mL de DMEM, com a superfície de esmalte voltada para cima, a qual foi lavada com 1 mL de água deionizada, com concomitante sucção. Após secagem da superfície, um disco de 5,2 mm de diâmetro de uma FC contendo 10% de PH (3D White; Crest Whitestrips®; Procter & Gamble; EUA) foi posicionado na superfície de esmalte e, em seguida, 100 µL de saliva artificial foi aplicada (20 Soares et al, 2011). O conjunto permaneceu em contato com o esmalte por 30 minutos em incubadora a 37°C e 5% de CO₂. Decorrido este período, a saliva foi aspirada e a FC removida, sendo realizada a aplicação de uma nova FC a qual permaneceu sobre o esmalte por mais 30 minutos. Imediatamente após o clareamento (total de 60 minutos), a FC foi removida e a superfície do esmalte lavada com 1 mL de água deionizada. O meio de cultura, contendo os componentes liberados da FC capazes de se difundir através do disco de esmalte e dentina, denominado de extrato, foi recolhido e 500 µL foram aplicados sobre as células MDPC-23 previamente cultivadas em placas de 24 compartimentos. O extrato permaneceu em contato com as células pelo período de 1 hora em incubadora, na temperatura de 37°C com 5% de CO₂ e 95% de ar. Em seguida, o extrato foi removido, as células lavadas com solução tampão de fosfatos (PBS) e incubadas com DMEM contendo 10% de SFB por 23 horas.

As CPAs foram transferidas para outra placa de 24 compartimentos contendo novo meio de cultura. Então, saliva artificial foi aplicada na superfície do esmalte, sendo que o conjunto CPA + disco de esmalte dentina foi mantido em incubadora até o próximo tratamento clareador. Este procedimento foi repetido diariamente durante 1 ou 5 dias, sendo desta forma avaliado o efeito de agressões diárias sobre as células odontoblastóides. Como controle positivo, foi realizada uma sessão de clareamento com um gel clareador com 35% de PH, caracterizada por 3 aplicações de 15 minutos, a qual foi realizada apenas no último

dia experimental (dia 5). O grupo controle negativo teve a superfície de esmalte em contato com saliva artificial no período de 24 horas durante 5 dias. Os grupos experimentais e controle estão demonstrados na Tabela 1.

Tabela 1. Distribuição dos grupos experimentais de acordo com o tratamento realizado na superfície de esmalte.

Grupos	Tratamento
G1 (controle negativo)	Saliva artificial
G2	1 dia de tratamento com a FC (2 aplicações diárias de 30 minutos cada)
G3	5 dias de tratamento com a FC (2 aplicações diárias de 30 minutos cada)
G4 (controle negativo)	3 aplicações de 15 minutos do gel clareador com 35% de PH

Avaliação do metabolismo celular (Teste de MTT)

A análise da atividade metabólica celular foi realizada por meio da demonstração citoquímica da desidrogenase succínica (SDH), que representa a taxa de respiração mitocondrial das células. Esse método é baseado na habilidade das mitocôndrias ativas de células vivas em converter o composto tetrazolium em um produto insolúvel. A enzima desidrogenase succínica das células viáveis quebra a estrutura do sal de tetrazolium, produzindo cristais de formazan de coloração azul. Assim, as diferentes tonalidades de azul são avaliadas em Leitor de Elisa. Após o último dia de tratamento das células com os extratos, o mesmo foi aspirado e uma solução contendo 900 µL de meio de cultura DMEM e 100 µL de solução de MTT (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA), na concentração de 5 mg/mL de PBS, foi aplicada em cada compartimento com a finalidade de identificar as células viáveis pela clivagem dos anéis de tetrazolium. As células imersas nesta solução foram incubadas por mais 4 horas a 37°C e 5% de CO₂. Em seguida, o meio de cultura com a solução de MTT foi aspirado e substituído por 600 µL de solução de isopropanol acidificado em HCl a 0,04 N para solubilizar os cristais formados pela degradação dos anéis de tetrazolium. Em seguida, três alíquotas de 100 µL foram transferidas para placas de 96 compartimentos (Costar Corp., Cambridge, MA, EUA). A viabilidade celular foi avaliada de maneira proporcional à absorbância determinada a 570 nm em leitor de ELISA (TP- Reader – ThermoPlate, Nanshan District, Shenzhen, China).

Atividade de Fosfatase Alcalina (ALP)

Para cada grupo, cinco compartimentos foram destinados à análise da atividade de fosfatase alcalina realizada segundo protocolo do Kit de Fosfatase Alcalina – Ensaio de Ponto Final (Labtest Diagnóstico S.A., Lagoa Santa, Minas Gerais, Brasil). Este ensaio utiliza o substrato de timolftaleína monofosfato, um substrato do éster do ácido fosfórico. A fosfatase alcalina hidrolisa a timolftaleína monofosfato liberando timolftaleína. Assim, é possível realizar a medida direta do produto de hidrólise, alterando-se o pH. O pH alterado promove a interrupção da atividade enzimática e a formação de cor azul característica do produto da reação, que é medida fotometricamente. Após período

de contato do extrato com as células, as mesmas foram lisadas com 1,050 mL de lauril sulfato de sódio 0,1% (Sigma – Aldrich, St. Louis, EUA) por 40 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, 50 µL de cada compartimento foram transferidos para tubos de ensaio contendo 50 µL de substrato (timolftaleína monofosfato 22 mmol/L - reagente nº 1 do Kit) e 500 µL de tampão (300 mmol/L, pH 10,1 - reagente nº 2 do Kit), mantidos previamente em banho-maria a 37°C. Após 10 minutos de incubação, foi acrescentado 2 mL de Reagente de Cor (carbonato de sódio 94 mmol/L e hidróxido de sódio 250 mmol/L – reagente nº 3 do Kit) em cada tubo. A absorbância dos tubos testes e branco foi determinada em leitor de ELISA, no comprimento de onda de 590 nm. Para normalização da fosfatase alcalina, foi realizada dosagem da proteína total. Ao restante da amostra de cada compartimento (1 mL), foram adicionados 1 mL de Solução de Reagente de Lowry (Sigma – Aldrich, St Louis, EUA), a qual permaneceu em contato por 20 minutos em temperatura ambiente. Após esse período, foram adicionados 500 µL de Solução de Folin e Ciocalteu's Phenol Reagent (Sigma – Aldrich, St Louis, EUA). Trinta minutos após, três alíquotas de 100 µL de cada tubo foram transferidas para uma placa de 96 compartimentos e a absorbância dos tubos testes e branco foi lida no comprimento de onda de 655 nm em leitor de ELISA. A dosagem de fosfatase alcalina e proteína total foram calculadas a partir de uma curva-padrão. O valor da atividade de fosfatase alcalina foi obtido a partir da divisão do valor da dosagem de fosfatase alcalina pelo valor da proteína total.

Análise de danos à membrana celular (Marcação para Iodeto de Propídeo - IP)

Os experimentos para a análise de danos à membrana celular foram realizados em citômetro de fluxo FACS Canto equipado com laser de argônio e software Cell-Quest (Becton Dickinson, San Jose, CA, EUA) (n=3). Para cada amostra foram coletados 10.000 eventos e as populações de células foram identificadas por suas características de tamanho e granulosidade e analisadas através da intensidade de fluorescência do marcador utilizado. Para análise de danos à membrana celular, foi utilizado o marcador fluorescente iodeto de propídeo (IP), o qual apresenta a capacidade de se ligar ao DNA apenas das células que apresentaram ruptura da membrana citoplasmática, o que reflete em morte celular por necrose. Após aplicação dos extratos sobre as células, as mesmas foram tripsinizadas e centrifugadas a 5.000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspendidas em 300 µL de tampão de ligação, contendo 10 mM de HEPES, com pH de 7,4, 150 mM de NaCl, 5 mM de KCl, 1 mM de MgCl₂ e 1,8 mM de CaCl₂. Alíquotas de 300 µL da suspensão celular foram tratadas com 1 µg/mL de IP, e a fluorescência foi avaliada imediatamente através do canal FL-2.

Tratamento estatístico dos dados

Para os produtos do metabolismo celular, quantificação de proteína total e atividade de fosfatase alcalina, os dados foram avaliados quanto a aderência a curva normal e homocedasticidade. Uma vez preenchidos esses requisitos (Shapiro-Wilk, p>0,05; Levene, p>0,05), o teste estatístico de análise de variâncias a um critério fixo (tratamento) foi aplicado. Testes complementares de Tukey também foram aplicados uma vez que a hipótese nula

de igualdade entre os tratamentos foi rejeitada. Todos os testes estatísticos foram considerados ao nível de significância de 5%. Para a citometria de fluxo, foi realizada análise descritiva dos dados.

RESULTADOS

Metabolismo Celular (Teste do MTT)

Os resultados de metabolismo celular, obtidos a partir do teste de MTT estão representados na Figura 1. Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos controle negativo G1 com os grupos submetidos a 1 (G2) ou 5 dias (G3) de clareamento com a FC ($p > 0.05$). Considerando como o grupo controle negativo apresentando 100% do metabolismo celular, os valores de metabolismo celular para G2 e G3 foram de 100,8% e 82,6%, respectivamente. Diferença significativa foi observada entre os controles G1 e G4 ($p < 0.05$). Para G4 (grupo controle positivo), a porcentagem de metabolismo celular foi de 58,5%. Ao se comparar os grupos G2 e G3 com o grupo G4 (controle positivo), diferença significativa foi observada apenas entre este último grupo e G4 ($p < 0.05$).

Atividade de Fosfatase Alcalina (ALP)

O valor de fosfatase alcalina foi normalizado pelo valor da quantificação de proteína total pelas células MDP-23. Para a atividade de fosfatase alcalina, nenhum dos tratamentos clareadores apresentou diferença estatisticamente significativa quando comparados aos grupos controle positivo e negativo (Figura 2) ($p > 0.05$). Entretanto, o aumento do número de aplicações da FC (5 dias) promoveu os maiores valores de redução da atividade desta proteína, sendo essa redução diferente estatisticamente de G2 (Figura 2) ($p < 0.05$).

Marcação para Iodeto de Propídeo (IP)

A análise por citometria de fluxo demonstrou que para G2 e G3, a porcentagem de células marcadas positivamente para IP foi de 13,4% e 14%, respectivamente, sendo semelhante àquela observada para o grupo controle negativo (15,2%). Já para o grupo controle positivo, a porcentagem de células marcadas foi de 23,7%, sendo 55,9% maior que a observada para o controle negativo (Figura 3).

DISCUSSÃO

Tal como em pesquisas anteriores, no presente estudo foram utilizados discos de esmalte/dentina adaptados a câmaras pulpare artificiais, cujo objetivo foi aproximar as condições experimentais *in vitro* da situação *in vivo*^{8,24,26-28}. Foram realizadas duas aplicações de 30 minutos de uma FC sobre a superfície de esmalte dos discos, sendo que o meio de cultura em contato direto com a dentina, o qual continha os possíveis produtos da difusão transamelodentinária da FC, foi aplicado sobre as células por 1 ou 5 dias, simulando uma agressão diária. Durante o contato da FC com a superfície de esmalte, saliva artificial foi adicionada sobre a fita buscando, dessa forma, simular as condições clínicas⁸.

Os resultados do presente estudo demonstraram que a aplicação da FC sobre o esmalte pelos períodos de 1 e 5 dias não causou redução significativa do metabolismo celular quando

comparado ao grupo controle negativo. Também não se observou diferença significativa quando foram realizadas aplicações diárias dos extratos sobre as células durante 5 dias consecutivos em comparação com o grupo controle positivo, onde se utilizou um gel com 35% de PH (3 aplicações de 15 minutos). Sendo assim, sugere-se que a repetida aplicação da FC com 10% de PH pode resultar em aumento do seu efeito citotóxico transamelodentiário sobre células odontoblastóides. Porém, a redução do metabolismo celular observada para o grupo clareado com a FC por 5 dias (G3) foi de 17,36%, sendo considerado discretamente citotóxico. Moderado efeito citotóxico foi observado no

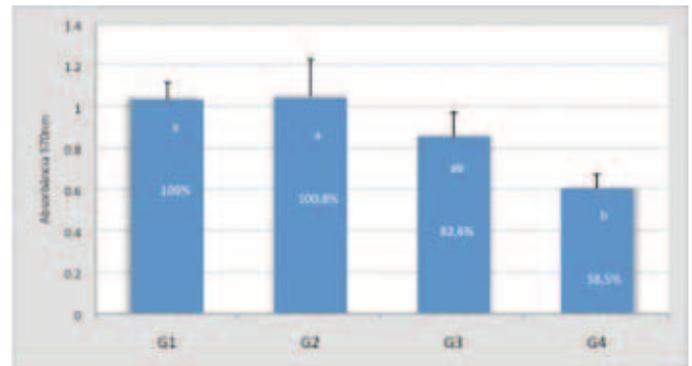


Figura 1. Representação gráfica dos valores da densidade óptica para o teste do MTT. Colunas representam médias ($n=5$) e barras desvio-padrão. Valores incluídos nas colunas representam porcentagem do metabolismo celular em relação ao controle negativo (G1 = 100%). Letras iguais indicam ausência de diferença estatística entre os grupos (Teste de Tukey; $\alpha=5\%$).

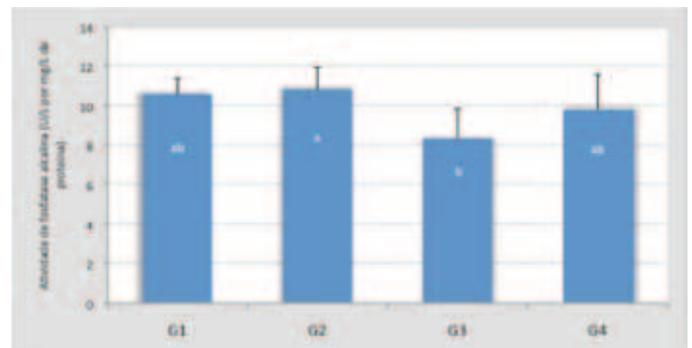


Figura 2. Representação gráfica dos valores de atividade de fosfatase alcalina em U/L por mg/L de proteína. Colunas representam médias ($n=5$) e barras desvio-padrão. Letras iguais indicam ausência de diferença estatística entre os grupos (Teste de Tukey; $\alpha=5\%$).

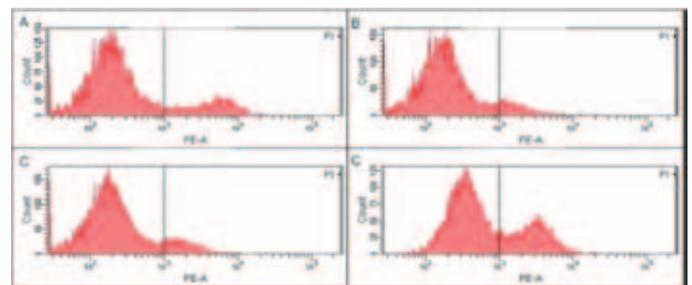


Figura 3. Imagens representativas das células marcadas positivamente com o marcador fluorescente IP na análise por citometria de fluxo. A - grupo controle negativo (G1); B - grupo clareado com a FC por 1 dia (G2); C - grupo clareado com a FC por 5 dias (G3); D - grupo controle positivo (G4). Note que o padrão de marcação para os grupos clareados com a FC foi semelhante ao observado para o grupo controle negativo.

grupo controle positivo, onde o metabolismo celular diminuiu 41,5%²⁹. Desta forma, apesar da semelhança estatística entre esses dois grupos, o dano celular gerado pela agressão diária da FC foi mais sutil que o observado para clareamento realizado com o gel com 35% de PH. Este fato foi confirmado quando da realização da análise das células por citometria de fluxo. Para o grupo controle positivo observou-se aumento em torno de 56% das células marcadas com IP em relação ao grupo controle negativo, comprovando que o PH é capaz de causar danos à membrana celular, com consequente morte das células por necrose. Já para G3, a porcentagem de células marcadas positivamente para IP foi semelhante àquela observada no grupo controle negativo (cerca de 14%). Assim, pode-se especular que a FC aplicada sobre o esmalte dentário não resultou em difusão transamelodentinária de seus componentes em quantidade suficiente para causar lesão irreversível nas células MDPC-23.

A citotoxicidade transamelodentinária de agentes clareadores já foi avaliada em estudos prévios^{8,24,26-28}. Algumas pesquisas demonstraram intensos danos às células odontoblastóides quando um gel com 35% de PH foi aplicado na superfície do esmalte. Foi observado redução de 92% do metabolismo das células MDPC-23 após 3 aplicações de 15 minutos de um gel clareador com 35% de PH sobre discos de esmalte/dentina adaptados a CPAs²⁷. No presente estudo, para o grupo controle positivo, onde 3 aplicações de 15 minutos do mesmo gel clareador foram realizadas, foi observada uma redução de 41,5% do metabolismo celular. Esta menor porcentagem de redução do metabolismo celular pode ser atribuída ao reduzido tempo de contato do extrato com as células (1 hora) quando comparado ao estudo citado anteriormente (24 horas)²⁷. Outras pesquisas demonstraram a citotoxicidade de agentes clareadores caseiros aplicados sobre discos de dentina ou de esmalte/dentina por períodos de 6 a 8 horas⁷⁻⁸. Nestes estudos, foi relatado que o extrato proveniente do gel clareador com 10% de PC (aproximadamente 3,5% de PH) quando aplicado sobre as células MDPC-23 por 1 hora não causou danos citotóxicos significantes. Entretanto, quando um gel com 16% de PC (aproximadamente 5,6% de PH) foi avaliado, a redução do metabolismo celular foi significativa (40%). No presente estudo, apesar da FC avaliada conter 10% de PH, não foram observados efeitos citotóxicos significantes para as células MDPC-23, mesmo após aplicação dos extratos por 5 dias consecutivos. Esta ausência de citotoxicidade da FC avaliada no presente estudo pode ser atribuída a dois fatores: forma de apresentação do produto e menor tempo de contato do mesmo com o esmalte dentário, o que pode ter limitado a difusão dos produtos tóxicos pela estrutura mineralizada do dente. Estudos prévios avaliaram a penetração de PH na câmara pulpar de dentes humanos extraídos após aplicação de diferentes agentes clareadores sobre o esmalte^{9,21-23}. A aplicação de uma FC contendo 5,3% de PH resultou em penetração de cerca de 0,726 µg/mL de PH na câmara pulpar após 30 minutos de contato com o esmalte²³. Quando um gel clareador com 10% de PC foi avaliado, cerca de 5,4 µg/mL de PH foi detectado na câmara pulpar após o mesmo período de clareamento (30 minutos)⁹. Assim, concentrações menores de PH se difundem até a câmara pulpar após aplicação das FCs quando comparadas ao gel clareador com 10% de PC, o que pode explicar a baixa citotoxicidade observada na presente pesquisa. Além disso, um estudo *in vitro*

demonstrou que a profundidade de clareamento proporcionada por uma FC contendo 8,1% de PH limitou-se à dentina superficial quando comparada a géis clareadores contendo 10% de PC para uso em moldeiras³⁰. Sendo assim, a quantidade reduzida de PH liberada de FCs, tal como a usada na presente pesquisa, associada a ação localizada e superficial desta espécie reativa derivada do oxigênio (ERO) e/ou seus derivados, não foi capaz de causar danos celulares e nem tampouco redução significativa no metabolismo das células MDPC-23.

No presente estudo, também foi avaliada a atividade de fosfatase alcalina (ALP) pelas células MDPC-23, a qual é uma proteína expressa por odontoblastos e atua na mineralização inicial da matriz dentinária³¹. Não foi observada redução significativa na atividade desta proteína para todos os grupos clareados com a FC em relação ao controle negativo, sendo que a maior redução observada foi para o grupo submetido a agressão diária com os extratos da FC por 5 dias (G3). Já foi demonstrado que o estresse oxidativo gerado a partir de baixas concentrações de PH aplicadas em cultura de células pulpares resultou em aumento na expressão de marcadores de diferenciação para odontoblastos, dentre eles a ALP^{12,31}, bem como formação de nódulos de mineralização^{12,31}. Assim, é possível que um estímulo de baixa intensidade é capaz de induzir a deposição e mineralização de matriz dentinária, favorecendo o processo de reparação do complexo dentino-pulpar^{12,31-35}. Porém, intensas agressões podem resultar em lesão celular, particularmente de odontoblastos, os quais revestem internamente a dentina^{25-28,36-37}. Na presente pesquisa, a aplicação por 1 dia do extrato sobre as células odontoblastóides resultou em tendência de aumento na atividade de ALP, a qual não foi estatisticamente significativa. Porém, a aplicação do extrato por 5 dias sobre as células em cultura resultou em tendência de diminuição na atividade de ALP e metabolismo celular, porém sem causar morte das células. Estes dados demonstram que a FC avaliada de acordo com a metodologia proposta na presente pesquisa não causa efeitos citotóxicos significativos indiretos para as células odontoblastóides MDPC-23. Apesar de não se poder extrapolar os resultados da presente pesquisa diretamente para situações clínicas, os dados obtidos neste estudo são interessantes, pois tem sido descrito que a eficácia clínica das FCs é similar ou superior ao clareamento com o PC a 10%^{18-19,30,38}. Deve-se levar em consideração, também, que em situações clínicas *in vivo*, alguns fatores, tais como pressão intrapulpar, exsudação de fluido dentinário e presença de prolongamentos citoplasmáticos dos odontoblastos, colágeno, além de outros componentes no interior dos túbulos dentinários podem diminuir ainda mais a difusão dos componentes de géis clareadores para a câmara pulpar¹³. Assim, futuros estudos *in vivo* deverão ser realizados para avaliar a limitada citotoxicidade das FCs, a qual pode ser resultado dos efeitos superficiais em dentina dos poucos componentes liberados destas fitas³⁰, bem como a definida ação clareadora das FCs³⁸.

CONCLUSÃO

De acordo com a metodologia empregada nesta pesquisa, foi possível concluir que a FC com 10% de PH não causou efeito citotóxico transamelodentinário significativo para as células odontoblastóides MDPC-23. Porém, o aumento na frequência de aplicação pode vir acompanhado de maiores efeitos tóxicos

para as células em cultura.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP (processos 2009/54315-7 e 2010/07954-1) e ao Conselho Nacional de Pesquisa - CNPq (Processo 301291/2010-1) pelo suporte financeiro para realização da presente pesquisa.

REFERÊNCIAS

- Sulieman MA. An overview of tooth-bleaching techniques: chemistry, safety and efficacy. *Periodontol* 2000. 2008;48:148-69.
- Haywood VB, Heymann HO. Nightguard vital bleaching. *Quintessence Int*. 1989;20(3):173-6.
- Haywood VB, Leonard RH, Nelson CF, Brunson WD. Effectiveness, side effects and long-term status of nightguard vital bleaching. *J Am Dent Assoc*. 1994;125 (9):1219-26.
- Swift EJ, May KN, Wilder AD, Heymann HO, Wilder RS, Bayne SC. Six-month clinical evaluation of a tooth whitening system using an innovative design. *J Esthet Dent*. 1997;9(5):265-74.
- Heymann HO, Swift EJ, Bayne SC, May KN, Wilder AD, Mann GB, et al. Clinical evaluation of two carbamide peroxide tooth-whitening agents. *Compend Contin Educ Dent*. 1998;19(4):359-74.
- Soldani P, Amaral CM, Rodrigues JA. Microhardness evaluation of in situ vital bleaching and thickening agents on human dental enamel. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 2010;30(2):203-11.
- Lima AF, Lessa FCR, Mancini MNG, Hebling J, De Souza Costa CA et al. Transdental protective role of sodium ascorbate against the cytopathic effects of H₂O₂ released from bleaching agents. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2010;109(4):e70-6.
- Soares DGS, Ribeiro APD, Sacono NT, Coldebella CR, Hebling J, De 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.
- Gökay O, Yilmaz F, Akin S, Tunçbilek M, Ertan R. Penetration of the pulp chamber by bleaching agents in teeth restored with various restorative materials. *J Endod*. 2000;26(2):92-4.
- Efeoglu N, Wood D, Efeoglu C. Microcomputerised tomography evaluation of 10% carbamide peroxide applied to enamel. *J Dent*. 2005;33(7):561-7.
- Rodrigues JA, Marchi GM, Ambrosano GM, Heymann HO, Pimenta LA. Microhardness evaluation of in situ vital bleaching on human dental enamel using a novel study design. *Dent Mater*. 2005;21(11):1059-67.
- Matsui S, Takahashi C, Tsujimoto Y, Matsushima K. Stimulatory effects of low-concentration reactive oxygen species on calcification ability of human dental pulp cells. *J Endod*. 2009;35(1):67-72.
- Sauro S, Pashley DH, Montanari M, Chersoni S, Carvalho RM, Toledano M et al. Effect of simulated pulpal pressure on dentin permeability and adhesion of self-etch adhesives. *Dent Mater*. 2007;23(6):705-13.
- Kihn PW, Barnes DM, Romberg E, Peterson K. A clinical evaluation of 10 percent vs. 15 percent carbamide peroxide tooth-whitening agents. *J Am Dent Assoc*. 2000;131(10):1478-84.
- Meireles SS, Heckmann SS, Santos IS, Della Bona A, Demarco FF. A double blind randomized clinical trial of at-home tooth bleaching using two carbamide peroxide concentrations: 6-month follow-up. *J Dent*. 2008;36(11):878-84.
- Meireles SS, Santos IS, Bona AD, Demarco FF. A double-blind randomized clinical trial of two carbamide peroxide tooth bleaching agents: 2-year follow-up. *J Dent*. 2010;38(12):956-63.
- Hasson H, Ismail AI, Neiva G. Home-based chemically-induced whitening of teeth in adults. *Cochrane Database Syst Rev*. 2006;18(4):CD006202.
- Swift EJ Jr, Heymann HO, Wilder AD Jr, Barker ML, Gerlach RW. Effects of duration of whitening strip treatment on tooth color: A randomized, placebo-controlled clinical trial. *J Dent*. 2009;37(Suppl 1): e51-6.
- Gerlach RW, Zhou X. Comparative clinical efficacy of two professional bleaching systems. *Compend Contin Educ Dent*. 2002;23(1):35-41.
- Karpinia K, Magnusson I, Barker ML, Gerlach RW. Clinical comparison of two self-directed bleaching systems. *J Prosthodont*. 2003;12(4):242-8.
- Benetti AR, Valera MC, Mancini MN, Miranda CB, Balducci I. In vitro penetration of bleaching agents into the pulp chamber. *Int Endod J*. 2004;37(2):120-4.
- 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.
- Gökay O, Müjdecı A, Algin E. In vitro peroxide penetration into the pulp chamber from newer bleaching products. *Int Endod J*. 2005;38(8):516-20.
- 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.
- De Lima AF, Lessa FCR, Mancini MNG, Hebling J, De Souza Costa CA, Marchi GM. Cytotoxic effects of different concentrations of a carbamide peroxide bleaching gel on odontoblast-like cells MDPC-23. *J Biomed Mater Res Part B: Appl Biomater*. 2009;90(2):907-12.
- Dias Ribeiro AP, Sacono NT, Lessa FCR, Nogueira I, Coldebella CR, Hebling J et al. Cytotoxic effect of a 35% hydrogen peroxide bleaching gel on odontoblast-like MDPC-23 cells. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2009;108(3):458-64.
- Trindade FZ, Ribeiro APD, Sacono NT, Oliveira CF, Lessa FCR, Hebling J et al. Trans-enamel and trans-dental cytotoxic effects of a 35% H₂O₂ bleaching gel on cultured odontoblast cell lines after consecutive applications. *Int endod J*. 2009;42(6):516-24.
- Sacono NT, Coldebella CR, Ribeiro APD, Soares DGS, Trindade FZ, Hebling J et al. Efeito citotóxico de agentes clareadores a base de peróxido de hidrogênio a 20% e 38% sobre células odontoblastóides. *ROBRAC*. 2010;18(48):15-21.
- ISO 10993-5:1999(E). Biological evaluation of medical devices – Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity. International Organization for Standardization. Second edition. 1999.
- Dietshi D, Benbachir N, Krejci I. In vitro colorimetric evaluation of the efficacy of home bleaching and over-the-counter bleaching products. *Quintessence Int*. 2010;41(6):505-16.
- 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(1):39-46.
- Cooper PR, Takahashi Y, Graham LW, Simon S, Imazato S, Smith AJ. Inflammation-regeneration interplay in the dentine-pulp complex. *J Dent*. 2010;38(9):687-97.
- Paula-Silva FW, Ghosh A, Silva LA, Kapila YL. TNF-alpha promotes

- an odontoblastic phenotype in dental pulp cells. *J Dent Res.* 2009;88(4):339-44.
34. Simon S, Smith AJ, Berdal A, Lumley PJ, Cooper PR. The MAP kinase pathway is involved in odontoblast stimulation via p38 phosphorylation. *J Endod.* 2010;36(2):256-9.
35. Lange J, Sapozhnikova A, Lu C, Hu D, Li X, Miclau T 3rd, Marcucio RS. Action of IL-1beta during fracture healing. *J Orthop Res.* 2010;28(6):778-84.
36. Martindale JL, Holbrook NJ. Cellular Response to Oxidative Stress: Signaling for Suicide and Survival. *J Cell Physiol.* 2002;192(1):1-15.
37. De Souza Costa CA, Riehl H, Kina JF, Sacono NT, Hebling J. Human pulp responses to in-office tooth bleaching. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2010;109(4):59-64.
38. Wiegand A, Drebenstedt S, Roos M, Magalhães AC, Attin T. 12-Month color stability of enamel, dentine, and enamel-dentine samples after bleaching. *Clin Oral Invest.* 2008;12(4):303-10.

ABSTRACT

Objective: To evaluate the cytotoxicity of a whitestrip (WS) with 10% hydrogen peroxide (HP) on cultured odontoblast-like cells. **Material and Methods:** Enamel/dentin discs were adapted to artificial pulp chambers and placed in wells with culture medium (DMEM). The WS was applied on enamel for 60 min (2 x 30 min) during 1 or 5 days. The extracts (DMEM + WS components that diffused across enamel and dentin) were applied to the cells for 1 h. In the positive control, the bleaching gel with 35% HP was applied for 45 min (3 x 15 min). In the negative control, no treatment was performed. The cell metabolism (MTT Assay) and alkaline phosphatase (ALP) activity were assessed and the data submitted to statistical analysis (One-way Anova/

Tukey's test; $\alpha=5\%$); Cell membrane damage was evaluated by flow cytometry. **Results:** For the MTT and ALP activity assays, there was no significant difference among the bleached groups with WS and negative control, regardless the time of WS application (1 or 5 days) on the cells ($p>0.05$). However, there was no significant difference among the bleached group with FC for 5 days and positive control. Flow cytometry analysis showed an increase of cell membrane damage only for the positive control. **Conclusion:** It was concluded that the whitestrip with 10% of HP did not cause significant trans-enamel and trans-dentinal toxic effects to the MDPC-23 cells.

KEYWORDS: Tooth bleaching; toxicity; odontoblasts.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA:

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