

EFEITOS CITOTÓXICOS E BIOCOMPATIBILIDADE DE AGENTES CLAREADORES USADOS NA ODONTOLOGIA. UMA REVISÃO DE LITERATURA

CYTOTOXIC EFFECTS AND BIOCOMPATIBILITY OF BLEACHING AGENTS USED IN DENTISTRY. A LITERATURE REVIEW

Carlos Alberto de Souza **COSTA***, Claudia **HUCK****

* Professor Livre-Docente do Departamento de Fisiologia e Patologia da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP

** Cirurgiã-Dentista. Mestre em Dentística Restauradora pela Faculdade de Odontologia de Araraquara / UNESP

Endereço para correspondência: Prof. Dr. Carlos Alberto de Souza Costa - Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, Departamento de Fisiologia e Patologia - Rua Humaitá, 1680 / CEP: 14.801-903 / CP: 331-Araraquara, SP – Brasil, E-mail: casouzac@foar.unesp.br

RELEVÂNCIA CLÍNICA

É importante para os cirurgiões dentistas o conhecimento sobre os componentes tóxicos presentes nas formulações dos agentes clareadores, bem como os possíveis riscos que os pacientes correm quando da realização indiscriminada do clareamento dentário em suas diversas modalidades de aplicação.

RESUMO

O clareamento dental foi introduzido na Odontologia há mais de 150 anos. Todavia, apenas nas últimas décadas o clareamento de dentes vitais e não vitais passou a ser amplamente divulgado e extensamente aplicado na prática odontológica. Diferentes tipos de agentes clareadores, associados a técnicas específicas de aplicação, têm permitido a realização deste procedimento com relativo sucesso, até mesmo quando o tratamento é realizado pelos próprios pacientes (clareamento caseiro). Todavia, pesquisas in vivo e in vitro têm demonstrado que componentes ativos dos agentes clareadores, incluindo o peróxido de hidrogênio, tem a capacidade de difusão através das estruturas dentárias para alcançar o espaço pulpar. Esta difusão ocorre de maneira mais significativa em dentes restaurados, através da infiltração dos agentes químicos pela interface dente/restauração, ou quando há exposição de dentina em casos de retração gengival, erosão, abfração e outros. Nesta situação, os efeitos citotóxicos dos agentes clareadores sobre células em cultura ou a irritação do tecido conjuntivo pulpar, associado ou não à sensibilidade pós-tratamento, estão diretamente relacionados com a quantidade de material que entra em contato com as células e/ou tecidos. Desta maneira, com o objetivo de prevenir danos ao complexo dentino-pulpar e sintomatologia dolorosa posterior, cuidados devem ser tomados na escolha do agente clareador e na sua técnica de aplicação, bem como na cuidadosa seleção dos pacientes que realmente necessitam do tratamento e que apresentam condições dentárias específicas para que se proceda o clareamento.

PALAVRAS CHAVE: Clareamento dental; citotoxicidade; biocompatibilidade; pulpa.

ABSTRACT

About 150 years ago the tooth bleaching was introduced in dentistry. However, this procedure has been widely accepted and employed in the clinical practice only in the last decades. Different compositions of bleaching agent associated with specific techniques of application have allowed the successful

bleaching of teeth even when performed by the patients at home. However, in vivo and in vitro studies have demonstrated that active chemical components of bleaching agents such hydrogen peroxide may diffuse across the tooth substrate (enamel and dentin) to reach the pulpal space. High diffusion rate of bleaching agent components may occurs particularly in restored dental cavities by leakage at the tooth/material interface, as well as in clinical situations in which the tubular dentin substrate is exposed to the oral environment. In these conditions, the cytotoxic effects of the bleaching agents associated or not with post-treatment sensitivity seem to be related with the amount of components that reach the connective tissue and their cells. Consequently, with the aim of preventing tissue damage and post-treatment pain, the clinicians should take care concerning the choice of the adequate bleaching agent and its correct technique of application as well as to select patients that definitively need to be submitted to the treatment.

KEYWORDS: Tooth bleaching; cytotoxicity; biocompatibility; pulp.

INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

O clareamento dental tem sido usado há mais de cem anos¹, sendo que desde então, variadas técnicas e componentes químicos têm sido utilizados com o objetivo de clarear o elemento dentário. Os primeiros métodos de clareamento dental utilizavam como agentes químicos ativos o cloreto de cálcio e soda¹, ácido acético, cianeto de potássio e ácido sulfúrico². Além destes, muitos outros métodos associados a diferentes componentes químicos foram empregados na odontologia, sendo que alguns agentes químicos não foram recomendados por apresentarem características venenosas ou mesmo causarem efeitos altamente tóxicos para os pacientes³. Naquela época, o clareamento dental era realizado em consultório odontológico em dentes sem vitalidade pulpar. O primeiro relato de clareamento de dentes com vitalidade pulpar ocorreu em 1868, sendo que neste procedimento clínico, realizado por Latimer⁴, foi utilizado o ácido oxálico.

O peróxido de hidrogênio foi introduzido como solução desinfetante e irrigadora dental por Harlan⁵ (1884), o qual sugeriu que esta substância também poderia ser utilizada como agente clareador de dentes escurecidos. No entanto, o clareamento de dentes com vitalidade pulpar utilizando o peróxido de hidrogênio começou efetivamente a ser realizado no início do Século XIX^{6,7,8}. Naquela época, o clareamento dental realizado em consultório odontológico, geralmente utilizava compressas de algodão embebidas em solução de peróxido de hidrogênio 30% associado a instrumentos

aquecidos, os quais aceleravam o processo de reação química do material sobre a estrutura dentária. Desde então, o peróxido de hidrogênio tem sido o princípio ativo da maioria dos agentes clareadores, e muitas técnicas têm sido desenvolvidas associando o peróxido de hidrogênio a outras substâncias ou métodos com a finalidade de potencializar seus efeitos⁶⁻⁸. Atualmente, existem duas principais técnicas de clareamento para dentes com vitalidade pulpar: a técnica de consultório e a técnica de clareamento caseiro supervisionada⁹.

Os agentes clareadores usados em consultório odontológico apresentam elevadas concentrações de peróxido de hidrogênio disponíveis na forma de solução, pasta ou gel. Tem sido descrito que o peróxido de hidrogênio na concentração de 35% é o mais utilizado para clareamento dental¹⁰. Esta técnica geralmente utiliza uma fonte de calor ou luz para acelerar o processo de reação do peróxido de hidrogênio¹¹.

A técnica de clareamento caseiro, introduzida por Haywood e Heymann⁹ no ano de 1989, consiste da utilização de agentes clareadores à base de peróxido de carbamida em concentrações mais baixas que os agentes de uso em consultório (10% a 16%) ou peróxido de hidrogênio (1,5% a 7,5%). Estes agentes químicos são utilizados pelos pacientes em aplicações diárias de 1 a 8 horas com moldeira personalizada, por períodos que podem variar de 2 a 4 semanas¹². Geralmente, o agente clareador é o peróxido de hidrogênio ou produtos que se desdobram em peróxido de hidrogênio, tal como o peróxido de carbamida 10% que se decompõe em uréia a 6,4% e

peróxido de hidrogênio a 3,6%. O peróxido de hidrogênio dissocia-se em água e oxigênio, e a uréia, por sua vez, decompõe-se em dióxido de carbono e amônia¹³.

O clareamento dental caseiro, apesar de caracterizar uma modalidade de tratamento mais lenta do que àquela realizada em consultório, tem sido amplamente empregada, principalmente pela sua praticidade e baixo custo. No entanto, atualmente há uma tendência para clareamento dental mais rápido, denominado de "Power Bleaching". Nesta técnica, a qual é realizada em consultório odontológico, a aplicação de agentes clareadores em altas concentrações é empregada, de tal maneira que, o paciente pode alcançar os resultados esperados em apenas uma única sessão¹⁴.

Um dos mais recentes avanços na área de clareamento dental realizado em consultório é a técnica da dupla ativação, onde os agentes químicos clareadores podem ser ativados tanto química como fisicamente, através da aplicação de uma fonte de luz. Os agentes clareadores de ativação dual apresentam, em sua composição, a associação de agentes espessantes, pigmentos e catalizadores físicos e químicos. Estes produtos geralmente contêm caroteno em sua composição, o qual, quando ativado por uma fonte de luz azul visível ou laser, converte a energia luminosa em calor, acelerando o processo da reação química dos agentes clareadores¹⁴.

Os mecanismos exatos do clareamento dental ainda não estão totalmente esclarecidos. A natureza química óxido-redutora dos agentes clareadores pode ser usada como base teórica no entendimento da dinâmica do processo de clareamento^{15, 16}.

Todos os agentes clareadores dentais, desde o peróxido de carbamida até o peróxido de hidrogênio, sofrem ionização e decomposição, produzindo radicais livres, os quais são altamente instáveis e apresentam notável capacidade de reagir com outras substâncias orgânicas^{15, 16}. A base da habilidade clareadora está no fato de que quando esses agentes reagem com moléculas orgânicas altamente conjugadas, eles rompem a conjugação do elétron e alteraram a absorção de energia da molécula, levando a alteração na sua estrutura óptica¹⁷. Isto pode resultar no deslocamento do

espectro de absorção do composto, transformando o composto com longo comprimento de onda (escuro) em outro com comprimento de onda mais curto e, portanto, mais claro¹⁸.

No entanto, as reações de radicais livres não são específicas apenas para moléculas pigmentadas dos dentes, podendo também, reagir potencialmente com outras estruturas orgânicas¹⁶. As espécies reativas derivadas do oxigênio são conhecidas como promotoras de injúrias às células vivas devido ao estresse oxidativo que promovem^{15, 19, 20}. O estresse oxidativo pode causar apoptose, danos ao DNA (genotoxicidade) e citotoxicidade celular^{15, 19, 20}. Portanto, possíveis alterações causadas por uso indiscriminado de agentes clareadores, podem potencialmente ocorrer em todos os tecidos dentais^{21, 22}.

A polpa dental é um tecido conjuntivo que apresenta íntimo relacionamento funcional e embriológico com a dentina. Por serem considerados indissociáveis, dentina e polpa deixaram de ser caracterizados como estruturas isoladas e desde então, passaram a se organizar numa estrutura única, denominada de complexo dentino-pulpar²³. Além disso, células da polpa podem responder às situações clínicas que causam injúrias ou perda da integridade dos tecidos duros dentais²³.

As respostas inflamatórias iniciais nos tecidos geralmente resultam em aumento localizado do fluxo sanguíneo e aumento da pressão intersticial, facilitando a remoção dos mediadores inflamatórios e substâncias irritantes²⁴. Dependendo da intensidade da resposta inflamatória, pode ocorrer aumento do volume do tecido com conseqüente elevação da pressão pulpar interna, e isto pode resultar em sérios danos para este tecido conjuntivo especializado, o qual está confinado dentro de um compartimento de tecido mineralizado sem capacidade de se expandir^{23, 24}. Assim, os efeitos citotóxicos de agentes químicos associados a sua capacidade de desencadear resposta inflamatória significativa na polpa, pode resultar em sérios danos a este tecido conjuntivo altamente especializado, o qual é responsável pela manutenção da dentina e apresenta notável capacidade de reparação quando submetido à agressão de variada origem. Conseqüentemente, materiais dentários ou

substâncias químicas tóxicas, que apresentam capacidade de difusão através dos túbulos dentinários para alcançar o tecido pulpar, podem causar danos irreversíveis à polpa ou mesmo induzir a um processo de morte e necrose tecidual. Este fato pode fazer com que determinados materiais e substâncias químicas ou mesmo alguns procedimentos clínicos sejam contra-indicados²⁵.

O procedimento de clarear o elemento dental é possível devido à permeabilidade da estrutura dental aos agentes clareadores^{26 - 28}, e ao baixo peso molecular de alguns componentes químicos ativos, tal como o peróxido de hidrogênio^{15, 26}. Estes dois fatores isoladamente, ou em conjunto, parecem facilitar a livre difusão dos agentes clareadores pelos tecidos dentais. Alguns autores mostraram que o peróxido de hidrogênio, mesmo em baixas concentrações, penetra muito facilmente no esmalte e se difunde em profundidade na dentina para alcançar a polpa dental^{11, 28 - 33}. Além disso, a difusão do peróxido de hidrogênio pelos tecidos dentais pode ser quantitativamente aumentada pelo contato do agente clareador com a dentina exposta em áreas de recessões gengivais, abrasões, erosões, desgastes, defeitos no esmalte, defeitos na junção cimento-esmalte, ou em áreas marginais entre o dente e a restauração^{11, 28, 29}. Recentemente, foi relatado que os maiores níveis de peróxido de hidrogênio na câmara pulpar foram encontrados em dentes que apresentavam restaurações e quando o peróxido de hidrogênio foi usado em altas concentrações^{11, 34}. Este fato parece tornar possível a ocorrência de efeitos tóxicos e adversos do peróxido de hidrogênio quando este agente químico é empregado em procedimentos clareadores inadequados, abusivos ou quando há situações de acidentes não intencionais.

Todos os materiais ou agentes químicos desenvolvidos para aplicação na área odontológica ou médica, antes de serem introduzidos no mercado, devem ser submetidos a testes preliminares de citotoxicidade e biocompatibilidade, os quais avaliam as propriedades biológicas e os fatores de risco. Especificamente para a área odontológica, a avaliação completa de um material dentário necessita, de acordo com a ANSI/ADA, ISO e FDI, passar por uma seqüência de testes, os quais estão divididos em três categorias: testes

iniciais, testes secundários e testes de aplicação clínica (pré-clínico). Os testes iniciais são realizados com a intenção de determinar os efeitos tóxicos de um material e inclui vários métodos, como por exemplo, o teste em cultura de células. Este teste, o qual é facilmente reproduzido, de desenvolvimento rápido e de custo relativamente baixo, determina, de maneira preliminar, o possível efeito citopático de um determinado material experimental ou de seus componentes isolados.

Por definição, citotoxicidade de um agente significa o efeito destrutivo que este agente provoca às células¹⁵. A interação dos materiais e seus componentes com as células em nível molecular é responsável por grande parte das reações teciduais, tais como inflamação, necrose, alterações imunológicas, mutagênicas e carcinogênicas. Além disso, os testes de citotoxicidade em cultura de células podem avaliar, também, os efeitos provocados por um determinado agente nas alterações metabólicas, crescimento das células, alterações na permeabilidade da membrana e citopatogenéticas. Desta maneira, testes iniciais foram recomendados e standardizados por importantes Organizações, Federações e Associações internacionais, e se caracterizam, até os dias de hoje, como métodos essenciais para se avaliar a toxicidade de um material ou técnica odontológica nova.

Até o momento existem poucos estudos relatando os efeitos citotóxicos dos agentes clareadores sobre as células da polpa^{29, 30, 35 - 39}, sendo que a maioria destes estudos foram realizados in vivo. Alguns estudos realizados in vitro^{28, 40 - 43} avaliaram os efeitos do peróxido de hidrogênio diretamente sobre fibroblastos de ratos em cultura. Todavia, não há relato de estudos de citotoxicidade do peróxido de hidrogênio sobre células de linhagem odontoblástica. Estudos com esta linhagem celular seria importante, desde que os odontoblastos são as primeiras células que entram em contato com as substâncias que por difusão ultrapassam o esmalte e dentina para alcançar a câmara pulpar⁴⁴. Também, a interação de uma substância com os variados componentes da estrutura dentinária podem produzir diferentes respostas do tecido pulpar^{45, 27}. Desta maneira, a dentina pode ser considerada como uma importante barreira para

a difusão de substâncias em direção à polpa dental. Neste ponto, os testes de citotoxicidade in vitro que incluem barreira dentinária, parecem se aproximar das condições clínicas²⁷. Estes testes devem ser incrementados para que se possa obter, através de pesquisas in vitro, dados científicos relevantes, os quais possam contribuir diretamente com o desenvolvimento de novos materiais e técnicas, assim como evitar a ocorrência de danos ao complexo dentino-pulpar quando da utilização de materiais tóxicos ou novos procedimentos clínicos agressivos. Desta maneira, a proposição deste trabalho foi rever a literatura específica relacionada com os efeitos citotóxicos de agentes clareadores quando aplicados sobre células em cultura, modelos experimentais onde se utilizou discos de dentina como barreira protetora e aplicação direta em dentes de animais e seres humanos.

DISCUSSÃO

De acordo com Wataha et al.⁴⁷ (1994), o risco que os materiais odontológicos representam para o complexo dentino-pulpar depende da habilidade de seus componentes se difundirem através da dentina e atingirem a polpa dental. Desta forma, alguns estudos comprovaram a difusão do peróxido de hidrogênio proveniente de agentes clareadores pelos tecidos dentais e determinaram a quantidade deste composto químico capaz de ultrapassar o esmalte e dentina para alcançar a polpa durante os procedimentos de clareamento dental^{11, 28, 31 - 34}. Estes estudos in vitro testaram diversos agentes clareadores em diferentes condições experimentais, variando suas concentrações e temperatura.

No trabalho de Bowles e Ugweneri³¹ (1987), foi demonstrado que o H₂O₂ penetra os tecidos duros dentais e atinge a câmara pulpar mesmo em baixas concentrações. Os autores determinaram, ainda, que a quantidade de peróxido de hidrogênio dentro da câmara pulpar pode aumentar com a elevação de sua concentração, sendo que para 1%, 10% e 30% os valores foram de 1,8 µg; 5,8 µg e 25,4 µg, respectivamente. Este resultado está em concordância com o estudo realizado mais recentemente por Gokay et al.¹¹ (2000) e Benetti et al.³⁴ (2004), os quais também concluíram que quanto mais elevada a concentração do agente

clareador aplicado sobre a estrutura dentária, maior a penetração do peróxido de hidrogênio dentro da câmara pulpar, especialmente se estes dentes apresentarem restaurações. Ainda dentro deste contexto, Gokay et al.¹¹ (2000) avaliaram a penetração do peróxido de hidrogênio em dentes restaurados com três tipos de materiais. Os resultados da pesquisa demonstraram a ocorrência de alta taxa de penetração de peróxido para todos os materiais testados. Todavia, a maior taxa de penetração de peróxido foi encontrada no grupo restaurado com resina modificada por ionômero de vidro (Vitremer), seguido do poliácido modificado por resina (Dyract) e por último o grupo da resina composta (Charisma), onde houve a menor taxa de penetração de peróxido. Os autores sugeriram que a quantidade de penetração pode ser afetada pelo tipo de material restaurador e que esta penetração é amplificada devido às propriedades do material restaurador com relação a infiltração marginal. Desde que sistemas adesivos têm sido amplamente utilizados para diversos procedimentos restauradores, e devido ao fato destes materiais resinosos melhorarem o selamento marginal de restaurações cavitárias, reduzindo a possibilidade de infiltração local, Benetti et al.³⁴ (2004) avaliaram, em dentes bovinos intactos e restaurados com Scotchbond Multipurpose (3M Dental Products) e resina composta Durafill (Heraeus Kulzer), a taxa de penetração de peróxidos através da interface dente/restauração. Os autores demonstraram que a maior penetração de peróxido dentro da câmara pulpar foi encontrada nos dentes restaurados expostos ao peróxido de carbamida 35% (0,7897 ± 0,3003 µg), seguido pelos dentes restaurados expostos ao peróxido de carbamida 10% (0,2954 ± 0,2354 µg) e dentes intactos expostos ao peróxido de carbamida 35% (0,1310 ± 0,0579 µg). Os dentes intactos submetidos à exposição com peróxido de carbamida 35% não mostrou ser estatisticamente diferente dos dentes não tratados (grupo controle), sugerindo, desta forma, que baixas concentrações de peróxido podem ser usadas com segurança em dentes restaurados. Por outro lado, Cooper et al.³² (1992) e Thintinthapan et al.³³ (1999) afirmaram que a difusão do peróxido de hidrogênio através da coroa dental não é

proporcional à concentração do agente químico aplicado, o qual parece estar associado aos componentes do produto. No primeiro estudo, foi testado o peróxido de carbamida nas concentrações de 10% e 15% e peróxido de hidrogênio 5% e 30% por 15 minutos a 37°C em dentes humanos extraídos. Os resultados mostraram que a quantidade de peróxido de hidrogênio encontrada no interior da câmara pulpar nos grupos submetidos ao peróxido de carbamida 10% e 15% foi de 3,3 µg e 4,8 µg, respectivamente. Os outros dois grupos que foram expostos ao peróxido de hidrogênio 5% e 30% tiveram um resultado de 10,4 µg e 40,4 µg, respectivamente. Os autores compararam o grupo experimental exposto ao peróxido de carbamida 15% com o grupo exposto ao peróxido de hidrogênio 5%. Esta comparação foi justificada pelo fato de que o peróxido de carbamida 15% possui um equivalente de peróxido de hidrogênio em torno de 5,25%. Assim sendo, uma menor quantidade de peróxido de hidrogênio atingiu a polpa através do peróxido de carbamida (4,8 µg) do que através do peróxido de hidrogênio livre a 5% (10,4 µg). Desta forma, os autores concluíram que a difusão do peróxido de hidrogênio através da coroa dental é de alguma forma limitada e que a taxa de difusão não é proporcional à concentração do peróxido de hidrogênio e sim pelos componentes do produto. Esta conclusão foi confirmada pelo trabalho de Thintanthapan et al.³³ (1999), onde foram testadas três marcas comerciais diferentes de peróxido de carbamida, todos em concentração de 10% (Opalescence, Sparkle, e Rembrandt). Os autores mostraram valores diferentes na difusão dos produtos testados, sendo que a quantidade média de peróxido de hidrogênio medida foi de: 3,605 ± 1,405 µg (Opalescence); 1,282 ± 0,762 µg (Sparkle); e 0,339 ± 0,251 µg (Rembrandt). A significativa diferença estatística entre os grupos levou os autores a concluir que a penetração do peróxido de hidrogênio para atingir a polpa dental varia significativamente em vários produtos comerciais, embora estes produtos apresentem a mesma concentração de peróxido. Foi relatado também que esta diferença pode estar associada à quantidade de carbopol (carboxypolyethylene polymer) no produto, uma vez que este composto é adicionado ao material com o objetivo de aumentar a viscosidade e retardar a liberação do

peróxido de hidrogênio.

Outro importante fator que parece ter relação direta com o aumento da difusão dos agentes clareadores através das estruturas dentárias para atingir a polpa dental é o calor³¹. O peróxido de hidrogênio e o calor são dois componentes importantes que fazem parte da técnica comumente usada no clareamento dental. O calor é aplicado com a finalidade de acelerar a reação química do peróxido de hidrogênio com as estruturas dentárias.

Bowles e Ugwenwri³¹ (1987), estudaram a difusão do peróxido de hidrogênio na concentração de 10%, quando aplicado por 15 minutos em dentes humanos hígidos extraídos. Os autores evidenciaram a ocorrência de significativo aumento na quantidade de peróxido de hidrogênio que se difundiu para dentro da câmara pulpar quando se realizou a elevação da temperatura, sendo de 9,3 µg à 37°C e de 25,5 µg à 50°C. Em estudo anterior, realizado por Outhwaite et al.⁴⁸ (1976), o aumento na temperatura de 25°C para 35°C, ou seja, uma variação de 10°C, quase duplicou a permeabilidade ao ¹²⁵I em discos de dentina obtidos de terceiros molares humanos. Com o objetivo de complementar estes estudos de associação de agente clareador com a aplicação de calor, algumas pesquisas foram realizadas in vivo (dentes humanos e de animais), com posterior avaliação histológica das condições do tecido pulpar^{29, 35, 36}. Cohen e Chase²⁹ (1979), fizeram a análise dos cortes histológicos do tecido pulpar de dentes pré-molares humanos submetidos ao clareamento com peróxido de hidrogênio 35% associado à aplicação de calor (variou de 46°C até 53°C), não sendo mostradas evidências de alterações teciduais significantes. Quando foram realizadas três sessões de 30 minutos de clareamento dental com intervalos de 24 horas entre as sessões e os dentes tratados foram extraídos em três diferentes períodos pós-operatórios: uma hora, 15 e 30 dias após o tratamento clareador, foi mostrado que, embora a sensibilidade dental ou dor espontânea pós-operatória tenha sido relatada por 73% dos pacientes, sua duração não ultrapassou 24 horas. A análise histopatológica mostrou que as condições pulpares dos grupos experimentais foram coerentes com o grupo controle (dentes não tratados) em todos os tempos pós-operatórios

analisados, sendo que a camada de odontoblastos estava intacta. Por outro lado, Robertson e Melf³⁵ (1980), encontraram alterações pulpares em dentes submetidos ao clareamento dental com peróxido de hidrogênio 35% associado ao calor. Os autores avaliaram histologicamente a resposta pulpar em dentes humanos hígidos submetidos à aplicação de duas sessões de 5 minutos de peróxido de hidrogênio na concentração de 35%, associado ou não à aplicação de calor (variação de 46°C até 51°C). Embora nesta pesquisa o tempo de exposição tenha sido de apenas 5 minutos, as avaliações histológicas destes dentes revelaram discreta resposta inflamatória limitada no tecido pulpar superficial dos dentes submetidos ao tratamento de calor associado ao peróxido de hidrogênio. O calor ou o peróxido de hidrogênio utilizados isoladamente não causaram significativa resposta inflamatória quando comparados com o grupo controle. A avaliação comparativa direta entre estas duas pesquisas desenvolvidas em dentes humanos não pode ser realizada, desde que os autores seguiram protocolos diferentes quanto ao tempo e técnica de aplicação do material, associado ou não a variação de temperatura. Todavia, está evidente que a aplicação de calor sobre a estrutura dentária com o objetivo de favorecer e acelerar o clareamento dental pode ocasionar danos ao tecido pulpar em períodos curtos de avaliação. Estes resultados observados para pesquisas realizadas em dentes de seres humanos se contrapõem àquelas realizadas em dentes de animais. Esta variação na característica e intensidade da resposta do complexo dentino-pulpar de acordo com os espécimes (dentes de animais e de seres humanos) tem sido intensamente discutida na literatura⁴⁹. Este fato pode ser comprovado através da análise crítica da pesquisa realizada em dentes de cães por Seale et al.³⁶ (1981). O tratamento realizado pelos pesquisadores consistiu de 4 aplicações de 30 minutos de peróxido de hidrogênio 35% e/ou calor (62°C) com intervalos de 1 semana entre as aplicações. As extrações foram realizadas nos períodos de 3, 15 e 60 dias após terminado o tratamento. Os resultados mostraram que aos 3 e 15 dias após o tratamento, havia resposta inflamatória intensa na polpa coronária dos dentes dos cães, com destruição dos odontoblastos, ausência de pré-

dentina não calcificada, denso infiltrado inflamatório e áreas de erosão sugestivas de reabsorção interna. Estes resultados foram semelhantes para os dentes tratados com peróxido de hidrogênio isoladamente ou peróxido de hidrogênio associado ao calor. No entanto, estas intensas alterações pulpares iniciais apresentaram evidências de reversibilidade após 60 dias. Já nos dentes tratados apenas com o calor, os exames histológicos não evidenciaram reações adversas nas polpas.

Os efeitos de agentes clareadores de uso caseiro com peróxido de carbamida 10%, também foram estudados através de análise clínica⁵⁰ e histológica^{39, 51}. No estudo realizado por Schulte et al.⁵⁰ (1994), os dentes foram expostos ao peróxido de carbamida 10% (Opalescence, Ultradent Products - técnica caseira), por um período de quatro semanas, em dois tempos de exposição: 2 horas e "overnight". Os resultados indicaram a aparente manutenção do tecido pulpar com características de normalidade. Recentemente, González-Ochoa⁵¹ (2002), avaliou histologicamente a polpa de dentes tratados com Opalescence, entre os períodos de 4 dias e 2 semanas. Os autores demonstraram que todas as polpas exibiam ausência de inflamação moderada ou severa após os dentes serem expostos ao peróxido de carbamida. Em apenas alguns dentes foram encontrados discreta reação pulpar com ocorrência casual de células inflamatórias, pouco extravasamento de células sanguíneas e alterações vasculares menores. Nenhuma reação pulpar foi observada nos dentes tratados por duas semanas seguidas de duas semanas de recuperação. Estes achados histológicos levaram os autores a concluir que o clareamento dental com peróxido de carbamida por até duas semanas pode ser considerado seguro para a polpa dental, e que as pequenas alterações pulpares causadas neste período são reversíveis dentro de duas semanas após o término do clareamento.

Com relação aos efeitos citotóxicos dos componentes dos agentes clareadores, alguns estudos *in vitro*, utilizando cultura de células, foram realizados^{28, 30, 38, 40 - 43}. Os testes de citotoxicidade em cultura de células podem avaliar os efeitos provocados por uma concentração específica do agente, seja

danificando componentes, estruturas ou passos bioquímicos dentro das células⁴⁷.

No trabalho de Bowles e Thompson³⁰ (1986) foi avaliado, em nível molecular, o efeito do peróxido de hidrogênio e do calor (50°C), individualmente ou em associação, sobre sete enzimas presentes no tecido pulpar de dentes bovinos, as quais estão diretamente envolvidas no metabolismo de glicose e aminoácidos. Os autores relataram que quase todas as enzimas sofreram certo grau de inibição pelo peróxido de hidrogênio em baixas concentrações (2,5% e 5%). O peróxido de hidrogênio na concentração de 15% (maior concentração avaliada), foi capaz de aumentar a inibição da atividade enzimática para todas as enzimas testadas. Estes resultados indicaram que o calor isoladamente (50°C), ou seja 13°C acima da temperatura pulpar fisiológica, apresenta pouco efeito sobre as enzimas pulpares avaliadas. Contudo, no tratamento combinado calor e peróxido de hidrogênio, até mesmo sob uma condição mais amena (peróxido de hidrogênio 2,5% e 50°C por 7,5 min.), ocorreu total inibição das enzimas G6-PDH e isocitrato desidrogenase, além de redução substancial da atividade de várias outras. Os autores concluíram que as enzimas pulpares são significativamente inibidas pelo peróxido de hidrogênio, principalmente quando associado ao calor, e afirmam que estes dados sugerem que a combinação de calor e peróxido de hidrogênio tem um potencial para danos biológicos. Apesar de não ser recomendado que dados científicos obtidos através do desenvolvimento de pesquisas *in vitro* sejam diretamente extrapolados para situações clínicas⁵², pesquisas em cultura de células, como esta realizada por Bowles e Thompson³⁰ (1986), parecem colaborar no esclarecimento dos mecanismos pelos quais componentes de agentes clareadores interagem com células e como estes agentes químicos desencadeiam respostas inflamatórias e/ou induzem apoptose ou morte celular *in vivo*. Isto porque, como demonstrado anteriormente, componentes de agentes clareadores podem se difundir através do esmalte e dentina para atingir o tecido pulpar. Por outro lado, em situações clínicas específicas, especialmente onde há exposição de dentina, tal como em pacientes com recessões gengivais, abfrações, erosões, áreas de desgastes por atrito, defeitos do esmalte ou da junção cimento-

esmalte e infiltrações marginais em restaurações, a polpa parece se tornar mais vulnerável aos efeitos tóxicos dos componentes químicos ativos dos agentes clareadores. De acordo com Hanks et al.²⁸ (1993), quando peróxidos são aplicados diretamente sobre dentina, onde há grande presença de túbulos dentinários, existe uma maior probabilidade de danos pulpares, particularmente devido à elevada permeabilidade da dentina exposta. Preocupados com a inadvertida exposição da dentina aos agentes clareadores dentais de uso caseiro, estes autores realizaram uma série de três experimentos, sendo que no primeiro deles foi estabelecida a dose inibitória de peróxido de hidrogênio para a atividade da enzima succinyl dehydrogenase de células Balb/c 3T3 cultivadas, *in vitro*, no período de 1 e 6 horas. O valor inibitório (ID₅₀) foi de aproximadamente 0,58 mmol/L para 1 hora e 0,44 mmol/L para 6 horas de contato do peróxido com as células cultivadas. Os autores observaram também que a atividade enzimática das células era suprimida com o aumento do tempo e da concentração de peróxido de hidrogênio. No segundo experimento, foi utilizado um dispositivo simulador de câmara pulpar para determinar a quantidade de peróxido de hidrogênio capaz de se difundir através de um disco de dentina de 0,5 mm de espessura, após a aplicação das seguintes marcas comerciais de agentes clareadores: BriteSmile – PH 10%, BriteSmile-PH 3%, Denta-Lite-PC 10%, Dentlbright-PC 10%, Rembrandt Lighten-PC 10%, e Union Broach Nu-Smile-PC 15%. Todos os produtos apresentaram difusão do peróxido de hidrogênio entre 1 e 6 horas, sendo que após 6 horas todos haviam excedido a dose inibitória pré-estabelecida. No terceiro experimento, os autores avaliaram a citotoxicidade do peróxido de hidrogênio para células Balb/c 3T3 (fibroblastos) cultivadas *in vitro*, onde relataram que em menos de 1 hora todos os produtos causaram efeitos citotóxicos definidos sobre as células. Os outros fatores testados, como a osmolaridade, permeabilidade da dentina e o pH dos agentes clareadores não mostraram correlação positiva com a citotoxicidade dos materiais testados sobre as células em cultura. Apesar da avaliação da citotoxicidade de um determinado material não corresponder diretamente aos dados científicos obtidos em outros estudos com o

mesmo material, devido aos diferentes tipos de células utilizadas, variados períodos de incubação e/ou diferentes condições experimentais, parece claro que mesmo baixas concentrações de agentes clareadores e resultam em intenso efeito citotóxico sobre diferentes linhagens celulares. Isto pode ser comprovado pela pesquisa desenvolvida por Koulaouzidou et al.⁴¹ (1998), os quais analisaram, *in vitro*, a citotoxicidade de um agente clareador com peróxido de uréia (Colgate Platinum) e do peróxido de hidrogênio, aplicados sobre duas linhagens de células L929 e BHK21/C13. Nas culturas contendo tanto o peróxido de uréia quanto o peróxido de hidrogênio, houve queda na densidade celular, confirmando o efeito citotóxico de ambos agentes clareadores, os quais mostraram efeito dose-dependente e também tempo-dependente na viabilidade celular. Todavia, a concentração de peróxido de hidrogênio capaz de causar inibição em 50% no número de células (ID_{50}) foi significativamente superior para as células L929 quando comparado com as células BHK21/C13, determinando a maior sensibilidade destas últimas aos compostos químicos testados.

Woovelton et al.⁴⁰ (1993), avaliaram a citotoxicidade, *in vitro*, promovida por dois agentes clareadores contendo peróxido de carbamida 10%, com adição de carbopol (Proxigel) ou não (Gly-Oxide) sobre fibroblastos de ratos (L929) em cultura. Os autores também compararam os resultados obtidos com estes materiais experimentais com os efeitos citotóxicos causados por outros sete produtos odontológicos de uso geral. Os resultados mostraram que houve 50% de morte celular (ID_{50}) em concentração de 0,62 mmol/L para o peróxido de carbamida sem carbopol e de 1,88 mmol/L para o peróxido de carbamida com carbopol. Nas comparações de citotoxicidade realizada entre os dois agentes clareadores e os sete materiais odontológicos, os autores puderam concluir que os dois peróxidos de carbamida testados não se mostraram mais tóxicos que os outros materiais odontológicos. Estes resultados *in vitro* estão de acordo com aqueles obtidos *in vivo* por Schulte et al.⁵⁰ (1994), González-Ochoa⁵¹ (2002) e Anderson et al.³⁹ (1999). Desta maneira, assim como demonstrado para pesquisas realizadas *in vivo*, esta pesquisa *in vitro* desenvolvida por Woovelton et al.⁴⁰ (1993) determinou que a

adição de carbopol ao agente clareador reduz o potencial citotóxico do material sobre células. Porém, contrário a estes dados científicos, Aren⁴² (2003), avaliou a citotoxicidade de dois agentes clareadores, um de uso em consultório odontológico e outro de uso caseiro. O autor encontrou valores de 60% na taxa de viabilidade celular para o peróxido de hidrogênio 35% (50 µg) e de 43,5% para o peróxido de carbamida 20% (40 µg) em relação ao grupo controle (99,1%) em cultura de células FM3A. Tal como descrito anteriormente, as diferentes linhagens celulares utilizadas nas variadas pesquisas poderiam justificar a discrepante sensibilidade destas células em cultura com relação aos materiais testados. Todavia, a pesquisa de Aren⁴² (2003), contrariou todos os dados *in vitro* e *in vivo* obtidos anteriormente, sendo que uma avaliação detalhada dos possíveis motivos desta variação dos resultados necessitam ser mais bem esclarecidos.

Além do efeito inibitório do peróxido de hidrogênio sobre as enzimas do tecido pulpar, Kanno et al.⁴³ (2003), também mostrou, *in vitro*, que o peróxido de hidrogênio 30% (30µM) por 24 horas produziu estresse oxidativo, causou citotoxicidade, apoptose e genotoxicidade sobre as células de ratos (P388). Os autores examinaram também um agente antioxidante natural (Naringin), o qual é um bioflavonoide encontrado em frutas cítricas, e avaliaram suas propriedades protetoras (antioxidantes e anti-apoptóticas) para estas células. Quando as células foram pré-tratadas por 15 minutos com o antioxidante Naringin ou a GSH (forma reduzida da glutathione, que é um típico antioxidante intracelular), houve redução na citotoxicidade celular, com supressão dos danos ao DNA celular. Os autores sugeriram que a provável causa desta proteção celular está relacionada à capacidade inibidora de apoptose que este antioxidante natural promove. Assim, agentes químicos clareadores poderiam causar danos celulares por ação oxidante direta sobre as membranas celulares. Isto poderia sugerir a inclusão de complemento vitamínico ou administração de drogas antioxidantes para pacientes que serão submetidos ao clareamento dental. Todavia, escassas são as pesquisas nesta área, sendo que investigações *in vivo* são necessárias para comprovar ou não estes dados científicos obtidos *in vitro*. Numa destas

pesquisas in vivo, Anderson et al.³⁹ (1999) investigaram a presença da enzima Heme oxigenase-1 (HO-1; Heat shock Protein 32 – HSP32) em dentes tratados com peróxido de carbamida 10% por 4 horas imediatamente antes das extrações. O aumento da HO-1 é uma reação de defesa contra os efeitos dos radicais livres, tal como o peróxido de hidrogênio (H₂O₂). As análises imunohistoquímicas para a HO-1 mostraram um resultado positivo para os odontoblastos adjacentes à superfície clareada. Porém, as células pulpares localizadas no centro da polpa e região radicular, mostraram resultado imunohistoquímico negativo. Estes dados científicos levaram os autores a sugerirem que odontoblastos localizados na polpa coronária e células endoteliais subjacentes podem ter um potencial para responder ao estresse oxidativo através do aumento da síntese de HO-1 (HSP32), sendo que este evento pode representar um componente inicial da resposta de defesa mediada por células específicas em locais estratégicos na polpa, precedendo o clássico trajeto inflamatório.

Os resultados dos estudos de citotoxicidade, in vitro, são mais previsíveis para riscos associados com efeitos tóxicos quando as concentrações testadas correspondem com as utilizadas in vivo, em tecidos ou aplicações locais. Contudo, certas limitações dos testes de citotoxicidade in vitro precisam ser reconhecidas ao se elaborar um estudo e interpretar os seus resultados. Existem diferenças substanciais, incluindo muitos parâmetros fisiológicos e bioquímicos, entre o ambiente de cultura celular e todo o sistema animal, in vivo. Os processos metabólicos em sistemas animais são mais complexos e dinâmicos que os processos em cultura de células¹⁵. Além disso, quando um agente é adicionado em cultura, ele está prontamente disponível para as células, o que não ocorre para os sistemas vivos. Um exemplo seria a interação de uma substância com a barreira de dentina, interagindo com seus componentes antes de atingir as células da polpa dental.

A dentina é um tecido capaz de seqüestrar ou se ligar a uma variedade de substâncias que se movem através dos túbulos dentinários, como por exemplo, os íons hidrogênio e muitas proteínas tais como a albumina e o fibrinogênio, que podem provocar uma diminuição na permeabilidade dentinária por obliteração

tubular²⁷. É importante entender que um material dentário considerado como altamente citotóxico quando aplicado diretamente sobre células em cultura, pode não impor significativo risco ao complexo dentino-pulpar quando da interposição de estruturas dentárias, tal como a dentina, a qual age como uma barreira biológica que reduz ou dilui os componentes solúveis dos materiais²⁷. Também a limitação dos efeitos citotóxicos pode ocorrer devido ao tempo insuficiente de contato dos componentes com os tecidos⁴⁷ e pela existência do sistema de defesa intrínseca do organismo^{20, 39, 38}. Todavia, as diversas metodologias recomendadas para avaliar os efeitos citotóxicos e a biocompatibilidade de novos materiais e técnicas de aplicação, trazem, a cada momento, dados científicos importantes, os quais somados, caracterizam e direcionam a segurança de sua aplicação clínica.

CONCLUSÃO

Baseado nos dados científicos disponíveis na área odontológica com relação aos efeitos citotóxicos e a biocompatibilidade dos agentes clareadores do elemento dental, foi possível concluir que:

1 - O peróxido de hidrogênio, o qual é citotóxico para a polpa, tem a capacidade de se difundir através dos tecidos dentais e atingir a polpa dental, mesmo quando utilizado em baixas concentrações;

2 - O carbopol (carboxypolyethylene polymer) é um componente químico que reduz o efeito tóxico do peróxido de hidrogênio;

3 - Os componentes químicos ativos presentes nos agentes clareadores inibem a atividade enzimática das células e agem como radicais livres sobre as membranas celulares, induzindo a apoptose ou morte celular;

4 - O risco que o peróxido de hidrogênio pode causar à polpa dental, depende de vários fatores:

§ Concentração no agente clareador;

§ Composição própria do agente clareador;

§ Capacidade de difusão transdentinária, seja pelo seu baixo peso molecular ou aumento da permeabilidade da dentina;

§ Tempo de exposição às células pulpares;

§ Temperatura utilizada para catalisar a

reação química do material.

REFERÊNCIAS

1. Dwinelle W W. Ninth Annual Meeting of American Society of Dental Surgeons. Article X. *Am J Dent Sci.* 1850; 1: 57-61. Retraction in: Haywood, V.B. History, safety, and effectiveness of current bleaching techniques and applications of the nightguard vital bleaching technique. *Quintessence Int.* 1992; 23 (7): 471- 88.
2. Fitch CP. Etiology of discoloration of teeth. *Dent Cosmos.* 1861; 3 (1): 133 –6.
3. Barker GT. The causes and treatment of discolored teeth. *Dent Cosmos.* 1861; 3 (3): 305-11.
4. Latimer JS. Notes from the discussion of the Society of Dental Surgeons in the city of New York. *Dent Cosmos.* 1868; 10 (5): 257-8.
5. Harlan AW. Proceedings of Dental Societies. American Dental Association- Twenty-third Annual Session. *Dent Cosmos.* 1884; 26 (1): 97-8.
6. Fisher G. The bleaching of discolored teeth with H₂O₂. *Dent Cosmos.* 1911; 53 (2): 246-7.
7. Prinz H. Recent improvements in tooth bleaching. *Dent Cosmos.* 1924; 66 (5): 558-60.
8. Ames JW. Removing stains from mottled enamel. *J Am Dent Assoc.* 1937; 24 (10): 1674-7.
9. Haywood VB; Heymann HO. Nightguard vital bleaching. *Quintessence Int.* 1989; 20 (3): 173-6.
10. Goldstein RE. In office bleaching: where we came from, were we are today. *J Am Dent Assoc.* 1997; 128 (4 Suppl): S11-15.
11. Gökay O, Yılmaz F, Akin S, Tunçbilek M, Ertan R. Penetration of the pulp chamber by bleaching agents in teeth restored with various restoratives materials. *J Endod.* 2000; 26 (2); 92-4.
12. Haywood VB. Nightguard vital bleaching: current concepts and reserch. *J Am Dent Assoc.* 1997; 128 (Suppl): S19-25.
13. Feinman RA, Goldstein RE, Garber DA. Bleaching teeth. Chicago: Quintessence Books; 1987.
14. Garber DA. Dentist-monitored bleaching: a discussion of combination and laser bleaching. *J Am Dent Assoc.* 1997; 128 (4 suppl): S26-30.
15. Li Y. Biological properties of peroxide-containing tooth whiteners. *Food and Chemical Toxicology.* 1996; 34 (5): 887-904.
16. Kawamoto K., Tsujimoto Y. Effect of the hydroxyl radical and hydrogen peroxide on tooth bleaching. *J Endod.* 2004; 30 (1): 45-50.
17. Sun G. The role of lasers in cosmetic dentistry. *Dent Clin North Am.* 1998; 44 (4): 83-49.
18. Seghi RR, Denry I. Effects of external bleaching on indentantion and abrasion characteristics of human enamel in vitro. *J Dent Res.* 1992; 71 (6): 1340-44.
19. Floyd RA. The effect of peroxides and free radicals on body tissues. *J Am Dent Assoc.* 1997; 128 (suppl): S37- 40.
20. Kanno, S, Shouji A, Asou K, Ishikava M. Effects of naringin on hydrogen peroxide-induced cytotoxicity and apoptosis in P388 cells. *J Pharmacol Sci.* 2003; 92 (4): 166-70.
21. Titley K, Torneck CD, Smith DC. Effect of concentrated hydrogen peroxide solution on the surface morphology of cut human dentin. *Endod Dent Traumatol.* 1988; 4 (1): 32-6.
22. Potonik I, Kosec L, Gašperšič D. Effect of 10% Carbamide peroxide bleaching gel on enamel microhardness, microestruture, and mineral contend. *J Endod.* 2000; 26 (4): 203-6.
23. Suda H, Ikeda H. The circulation of the pulp. In: Hargreaves KM, Goodis HE. Seltzer and Bender's dental pulp. Carol Stream: Quintessence Publishing; 2002. p. 123-50.
24. Tonder KJ, Kvinnsland I. Micropuncture measurements of interstitial fluid pressure in normal and inflamed dental pulps in cats. *J Endod.* 1983; 9 (3): 105-9.
25. Costa CAS, Mesas AN, Hebling J. Pulp response to direct caping with an adhesive system. *Am J Dent.* 2000; 13 (2): 81-7.
26. Arwill T, Myrberg N, Soremark R. Penetration of radioactive isotopes through enamel and dentin. II. Transfer of ²²Na in fresh and chemically treated dental tissues. *Odontol Revy* 1969; 20 (1): 47-54.
27. Pashley DH, Andringa HJ, Derkson GD, Derkson ME, Kalathoor SR. Regional variability in permeability of human dentine. *Arch Oral biol.* 1987; 32 (7): 519-23.
28. 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.
29. Cohen SC, Chase C. Human pulpal response to bleaching procedures on vital teeth. *J Endod.* 1979; 5 (5): 134-8.

30. Bowles WH, Thompson HR. Vital bleaching: the effects of heat and hydrogen peroxide on pulpal enzymes. *J Endod.* 1986; 12 (3): 108-12.
31. Bowles WH, Ugweneri Z. Pulp chamber penetration by hydrogen peroxide following vital bleaching procedures. *J Endod.* 1987; 13 (8): 375-7.
32. Cooper JS, Sokmeyer TT, Bowles WH. Penetration of the pulp chamber by carbamide peroxide bleaching agents. *J Endod.* 1992; 18 (7): 315-7.
33. Thitinanthapan W, Satamanont P, Vongsavan N. In vitro penetration of the pulp chamber by three brands of carbamide peroxide. *J Esthet Dent.* 1999; 11 (5): 259-64.
34. Benetti AR, Valera MC, Mancine MNG, Miranda CB, Balducci I. In vitro penetration of bleaching agents into the pulp chamber. *Int Endod J.* 2004; 37 (2): 120-4.
35. Robertson WD, Melfi RC. Pulp response to vital bleaching procedures. *J Endod.* 1980; 6 (7): 645-9.
36. Seale NS, McIntosh JE ; Taylr AN. Pulpal reaction to bleaching of teeth in dogs. *J Dent Res.* 1981; 60 (5): 948-53.
37. Baumgartner JC, Reid DE, Pickett AB. Human pulpal reaction to the modified McInnes bleaching technique. *J Endod.* 1983; 9 (12): 527-9.
38. Bowles AR, Burns Jr. H. Catalase/peroxidase activity in dental pulp. *J Endod.* 1992; 18 (11): 527-9.
39. Anderson DG, Chiego DJ, Glickman GN, McCauley LK. A clinical assessment of the effects of 10% carbamide peroxide gel on human pulp tissue. *J Endod.* 1999; 25 (4): 247-250.
40. Woolverton CJ, Haywood VB, Heymann HC. Toxicity of two carbamide peroxide products used on nightguard vital bleaching. *Am J Dent.* 1993; 6 (6): 310-4.
41. Koulaouzidou E, Lambrianidis T, Konstantinidis A, Kortsaris AH. In vitro evaluation of the cytotoxicity of a bleaching agent. *Endod Dent Traumatol.* 1998; 14 (1): 21-5.
42. Aren, G. In vitro effects of bleaching agents on FM3A cell line. *Quintessence Int.* 2003; 34 (5): 361-5.
43. Kanno S, Shouji A, Asou K, Ishikawa M. Effects of naringin on hydrogen peroxide-induced cytotoxicity and apoptosis in P388 cells. *J Pharmacol Sci.* 2003; 92 (4): 166-70.
44. Costa CAS, Vaerten MA, Edwards CA, Hanks CT. Cytotoxic effects of current dental adhesive systems on immortalized odontoblast cell line MDPC-23. *Dent Mater.* 1999; 15 (6): 434-41.
45. Abou Hashieh I. et al. Relationship between dentine hydraulic conductance and cytotoxicity of four dentine bonding resins in vitro. *J Dent.* 1998; 26 (5-6): 473-77.
46. Pashley DH. Consideration of dentine permeability in cytotoxicity testing. *Int Endod J.* 1988; 21 (2): 143-54.
47. Wataha JC, Hanks CT, Strawn SE, Fat JC. Cytotoxicity of componentes of resins and other dental restorative materials. *J Oral Rehabil.* 1994; 21 (4): 453-62.
48. Outhwaite WC, McKenzie, DM, Pashey, DH. A versatile split-chamber device for studing dentin permeability. *J.Dent Res.* 1974; 53 (6): 1503.
49. Costa CAS, Oliveira MF, Giro EM; Hebling J. Biocompatibility of resin-based materials used as pulp-capping agents. *Int Endod J.* 2003; 36 (12): 831-9.
50. Schulte JR, Morrissette DB, Gasior EJ, Czajewski MV. The effects of bleaching application time on the dental pulp. *J Am Dent Assoc.* 1994; 125 (10): 1330-5.
51. González-Ochoa JG. Histological assessment of dental pulp after vital bleaching with 10% carbamide peroxide. [Thesis MSD]. Indiana: University School of Dentistry; 2002.
52. Costa CAS, Edwards CA, Hanks CT. Cytotoxic effects of cleasing solutions recommended for chemical lavage of pulp exposures. *Am J Dent.* 2001; 14 (1): 25-30.