

Efeito citotóxico de géis clareadores com diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio aplicados diretamente sobre a dentina

Cytotoxic effects of a bleaching gel with different concentrations of hydrogen peroxide applied directly on dentin

Cláudia HUCK, DDS, MSc^a; Edson A. CAMPOS DDS, MSc, PhD^a; Diana G. SOARES, DDS, MSc, PhD^b; Josimeri HEBLING DDS, MSc, PhD^c; Débora L. S. SCHEFFEL, DDS, MSc, PhD^c; Carlos A. S. COSTA, DDS, MSc, PhD^b

A - Departamento de Dentística Restauradora, Faculdade de Odontologia de Araraquara, UNESP- Univ. Estadual Paulista, Araraquara, SP. Brasil.

B - Departamento de Fisiologia e Patologia, Faculdade de Odontologia de Araraquara, UNESP- Univ. Estadual Paulista, Araraquara, SP. Brasil.

C - Departamento de Clínica Infantil, Faculdade de Odontologia de Araraquara, UNESP- Univ. Estadual Paulista, Araraquara, SP. Brasil.

RESUMO

Objetivo: Avaliar os efeitos citotóxicos de agentes clareadores com diferentes concentrações de PH sobre células odontoblastóides, quando aplicados diretamente sobre a superfície de dentina humana. **Material e método:** Cinquenta discos de dentina (0,5 mm de espessura) foram adaptados em câmaras pulpares artificiais (CPAs) e células MDPC-23 foram semeadas na superfície pulpar dos discos. Cinco grupos (n=10) foram estabelecidos: G1: 7,5% PH; G2: 20% PH; G3: 35% PH; G4: gel sem PH; G5: DMEN (controle). Os produtos foram aplicados na superfície oclusal dos discos por 2x de 15 minutos. A viabilidade (ensaio de MTT) e a morfologia celular (MEV) foram avaliadas imediatamente após o clareamento. Os dados de viabilidade celular foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney ($\alpha=0,05$). **Resultados:** Redução significativa na viabilidade celular em relação ao contro-

le (G5) foi observada para todas as concentrações de PH ($p<0,05$), associada a intensas alterações na morfologia celular. Entretanto, nenhuma diferença significativa foi observada entre as três concentrações de PH. Também, não houve diferença estatística entre o grupo controle e o grupo gel sem PH (G5 e G4). **Conclusão:** Todas as concentrações de PH causaram efeitos citotóxicos de severos sobre as células MDPC-23, quando aplicados diretamente sobre a dentina. Entretanto, a intensidade do efeito tóxico não foi influenciada pela concentração de PH no agente clareador. **Relevância clínica:** Apesar das limitações deste estudo in vitro, os resultados indicam que o clareamento dental não deve ser realizado diretamente em áreas com exposição da dentina.

Descritores: Clareamento dental; Citotoxicidade; Dentina; Odontoblastos; Permeabilidade dentinária; Peróxido de hidrogênio.

INTRODUÇÃO

Para que o clareamento dental seja efetivo é necessário que o peróxido de hidrogênio (PH) e suas moléculas de degradação se difundam pelo esmalte dental e atinjam a dentina subjacente, tecido este que concentra a maior quantidade de cromóforos¹. No entanto, estudos prévios²⁻⁶ demonstraram que o PH proveniente de agentes clareadores é capaz de atravessar toda a estrutura mineral do dente (esmalte e dentina) e atingir a câmara pulpar, sendo esta difusão diretamente proporcional à concentração de PH no agente clareador e ao tempo de contato do produto com a superfície dental. Uma vez em contato com o tecido pulpar, o PH é capaz de atravessar membranas celulares, sendo dissociado em radicais livres no citoplasma, o que resulta no estabelecimento do estado de estresse oxidativo^{2,7}. Estudos histopatológicos demonstraram o desencadeamento de resposta inflamatória aguda no tecido pulpar de dentes humanos e de animais como consequência deste processo⁸⁻¹⁰. Estes efeitos celulares têm sido relacionados à sensibilidade pós-clareamento, a qual é o efeito adverso mais prevalente da técnica do clareamento dental¹¹⁻¹⁵.

Estudos prévios demonstraram que tanto a concentração do PH presente no agente clareador, bem como a espessura e presença de alterações estruturais do tecido mineralizado dental submetido ao clareamento apresentam importante papel nos efeitos tóxicos da técnica clareadora sobre o tecido pulpar^{2,3,7,15-18}.

Apesar do substrato dentinário ser considerado como importante barreira para difusão de substâncias tóxicas em direção à polpa dental, este é um tecido altamente permeável devido ao menor conteúdo mineral e à estrutura morfológica característica formada por túbulos dentinários, os quais promovem um elo de ligação direta entre a superfície da dentina e a polpa¹⁹. Desta forma, a difusão do PH através da dentina pode ser significativamente aumentada pelo contato direto dos agentes clareadores com este tecido, particularmente em áreas de recessões gengivais, abfrações, abrasões, erosões, defeitos do esmalte e fendas na junção cimento-esmalte^{16,20-21}. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar a citotoxicidade de agentes clareadores com diferentes concentrações de PH sobre células do tipo odontoblasto (MDPC-23), quando aplicados diretamente sobre a superfície de dentina humana, com o objetivo de simular a situação clínica de clareamento de dentes vitais que apresentam áreas de exposição dentinária.

MATERIAL E MÉTODOS

Preparo dos discos de dentina

Cinquenta discos de dentina com 0,5 mm de espessura foram obtidos a partir do corte transversal da coroa de terceiros molares humanos íntegros extraídos por razões ortodônticas e

doados por pacientes após autorização via assinatura de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, conforme protocolo no. 37/04 do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Araraquara, SP, Brasil. Após o corte, os discos foram manualmente polidos com lixas de papel abrasivo siliconado número 400 e 600 (T469-SF- Noton, Saint-Gobam Abrasivos Ltda., Jundiaí, SP, Brasil), submetidos à desinfecção com etanol 70% por um período de 6 horas²², tratados com solução de EDTA 0,5M, pH 7,2 por 1 minuto para remoção da *smear layer*²³ e estocados em solução tampão salina (PBS, pH=7,4) até o uso.

Análise da condutância hidráulica (permeabilidade dentinária)

A condutância hidráulica (Lp: mL cm⁻² min⁻¹ cm H₂O) de cada disco de dentina foi determinada usando uma coluna de água de 180 cm, como descrita por Outhwaite et al.²⁴ (1974), com a intenção de reduzir a interferência da permeabilidade dentinária (fator de confundimento) devido a variações anatômicas da dentina em diferentes dentes. Os cinquenta discos foram então distribuídos em 5 grupos contendo dez discos cada, de tal modo que a análise estatística dos dados da condutância hidráulica (Kruskal-Wallis) mostrou permeabilidade dentinária similar entre os grupos (p=1.000) (Tabela 1).

Câmara pulpar artificial (CPA)

Para a análise da viabilidade celular, os discos de dentina foram individualmente adaptados em câmaras pulpares artificiais (CPAs), conforme descrito previamente por Lima et al.²⁵ (2010). As CPAs com os discos em posição foram autoclavadas individualmente em recipientes de vidro contendo água deionizada, pelo período de 15 minutos, à 120° C e pressão de 1 Kg/força.

Cultura das células MDPC-23

As células odontoblastóides MDPC-23²⁶ foram mantidas em meio para cultura (Dulbecco's Modified Eagle's Medium - DMEM; Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, EUA) com 10% de soro fetal bovino (FBS, Cultilab, Campinas, SP, Brasil) suplementado com 100 UI/mL de penicilina, 100 mg/mL de estreptomicina e 2 mmol/L glutamina (Gibco, Grand Island, NY, EUA). As CPAs com os discos de dentina foram posicionadas em placas de cultura de 24 compartimentos (Costar Corp., Cambridge, MA, EUA) com a superfície pulpar de cada disco voltada para cima. As células foram então semeadas (50.000 células) na superfície pulpar de cada disco e as placas contendo as CPAs foram mantidas por 72 horas em incubadora com atmosfera úmida a 37°C com 5% de CO₂ e 95% de ar.

Procedimento clareador

Decorridas as 72 horas, as CPAs foram transferidas para novas placas e posicionadas nos compartimentos com a superfície pulpar dos discos voltadas para baixo, de tal forma que as células semeadas sobre o disco de dentina poderiam permanecer em contato com o meio de cultura. O agente clareador foi aplicado na superfície oclusal dos discos, simulando as condições clínicas. Um agente clareador (Lase Peroxide, DMC Products, São Carlos, SP, Brazil) contendo peróxido de hidrogênio (PH) em concentrações de 7,5%, 20% ou 35% foi utilizado. Como grupos controle, foi empregado um gel sem o PH (gel livre de PH)

ou nenhum tratamento foi realizado na dentina. O gel livre de PH, preparado pelo mesmo fabricante, era constituído pelos mesmos componentes dos agentes clareadores experimentais citados anteriormente, porém sem incorporação de PH. Aproximadamente 27 mg de agente clareador foi aplicado na superfície oclusal de cada disco de dentina por 30 minutos, divididos em duas aplicações de 15 minutos. Para isso, após a primeira aplicação, o gel foi removido por aspiração com cânula suctora e nova quantidade de agente clareador foi imediatamente reaplicado por mais 15 minutos. Finalizado o tratamento, o gel foi novamente removido por aspiração e a superfície dos discos foi lavada com 1 mL de solução tampão salina (PBS) com concomitante sucção.

Análise da viabilidade celular

A viabilidade das células que permaneceram aderidas ao substrato dentinário foi avaliada por meio do ensaio de MTT como descrito por Dias Ribeiro et al.²⁷ (2009). As CPAs foram posicionadas de forma invertida em novas placas de 24 compartimentos. Em cada compartimento da placa foram adicionados 900 µL de DMEM e 100 µL da solução de MTT (5 mg/mL), seguido de incubação a 37°C por 4 horas. Após este período a solução DMEM/MTT foi aspirada e substituída por 250 µL de solução de isopropanol acidificado (0,04 N HCl) com a intenção de dissolver os cristais de formazan presentes nas células. Em seguida, 2 alíquotas de 100 µL de cada disco foram transferidas para uma placa de 96 compartimentos (Costar Corp.) para leitura da absorbância a 570 nm em leitor de ELISA (Multiskan, Ascent 354, Labsystems CE, Lês Ulis, França).

Análise da morfologia celular em microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Quatro amostras representativas de cada grupo foram selecionadas e preparadas para ensaio da morfologia celular em MEV (ZEISS DSM 940 A, Cal Zeiss Inc., Oberkochen, Alemanha). Para este propósito, os discos de dentina com as células aderidas foram cuidadosamente removidos das CPAs e imediatamente imersas em glutaraldeído 2,5% por 24 horas e após este período fixadas em solução de tetróxido de ósmio 1% (Electron Microscopy Science, Fort Washington, PA, EUA) por 60 minutos. Em seguida, as células foram lavadas com PBS, desidratadas em soluções com concentrações crescentes de etanol (30, 50, 70, 95 e 100%) e finalmente mantidas por 30 minutos em 1,1,1,3,3,3-hexamethyldisilazane (Across Organics, Morris Plains, NJ, NY, EUA). Os discos de dentina com as células aderidas sobre eles foram aderidos em suportes metálicos, mantidos por 12 horas em dessecador. Decorrido esse período, os suportes contendo os discos foram metalizados (Balzers Ockenheimer Graben, Bingen, Alemanha), permitindo a análise da morfologia celular em MEV.

Análise estatística

O conjunto de dados de viabilidade celular não apresentou distribuição normal e, portanto, esses dados foram submetidos aos testes estatísticos não paramétricos de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney, para comparação dos grupos aos pares. As inferências estatísticas foram baseadas no nível de significância de 5%, isto é, grupos foram considerados estatisticamente diferentes quando p<0,05.

RESULTADOS

Viabilidade celular

O teste de Kruskal-Wallis mostrou haver diferença estatisticamente significativa entre os grupos com relação aos dados do MTT ($p < 0.0001$). Foi observada diferença significativa entre os grupos submetidos ao clareamento (G1, G2 e G3) em relação ao grupo controle negativo (G5) e ao grupo G4 (gel livre de PH). Entretanto, nenhuma diferença foi observada entre os grupos G1 (PH 7,5%), G2 (PH 20%) e G3 (PH 35%) e entre os grupos G4 e G5 (Tabela 2). Considerando que o grupo controle negativo (G5) representa 100% da viabilidade celular, a redução da viabilidade das células odontoblastóides para os grupos G1, G2, G3 e G4 foi de 62,7%, 62,3%, 65,7% e 17%, respectivamente (Tabela 2).

Tabela 1 - Mediana, média e desvio padrão da condutância hidráulica ($\mu\text{L}/\text{min}$) dentinária para os grupos experimentais e controle.

Groups	n	Mediana	Média	Desvio Padrão
PH 7,5% (G1)	10	0,00440	0,00443	0,00230
PH 20% (G2)	10	0,00453	0,00480	0,00228
PH 35% (G3)	10	0,00430	0,00428	0,00232
Gel livre de PH (G4)	10	0,00448	0,00480	0,00230
Nenhum tratamento (G5)	10	0,00433	0,00435	0,00231

PH: peróxido de hidrogênio

Não houve diferença estatística entre os grupos (Kruskal-Walli, $p=1,000$)

Tabela 2 - Viabilidade de células MDPC-23 em contato com diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio (PH) difundido através de discos de dentina com 0,5 mm de espessura.

Peróxido de Hidrogênio	Viabilidade celular*	Comparação Estatística**	% redução da viabilidade***
PH 7,5% (G1)	0,051 (0,049-0,052)	b	62,7
PH 20% (G2)	0,051 (0,048-0,053)	b	62,3
PH 35% (G3)	0,047 (0,044-0,048)	b	65,7
Gel livre de PH (G4)	0,114 (0,106-0,129)	a	17,0
Nenhum tratamento (G5)	0,127 (0,115-0,154)	a	0

* Mediana (percentil 25-percentil 75), $n=6$ ** Os grupos identificados pela mesma letra não diferem estatisticamente (Mann-Whitney, $p > 0.05$). *** Calculada no valor do grupo controle (G5), onde 0,127=100% viabilidade celular.

Morfologia Celular

A análise em MEV demonstrou que apenas um número reduzido de células MDPC-23 permaneceram aderidas a dentina nos grupos que receberam a aplicação de peróxido de hidrogênio, independentemente da concentração. O desprendimento das células da superfície de dentina deixou os túbulos dentinários aparentes (Figura 1A, 1B e 1C). As células que permaneceram aderidas apresentaram como característica predominante um formato arredondado e achatado, com ausência de processos citoplasmáticos. No Grupo 3 (PH 35%) foram observados restos celulares espalhados sobre a superfície de dentina (Figura 1C). Quando foi aplicado o gel livre de PH (Grupo 4), a superfície

pulpar dos discos de dentina permaneceu coberta por células achatadas com amplo citoplasma e múltiplos processos citoplasmáticos alongados (Figura 2A), características morfológicas dessas características das células MDPC-23, como observado para o grupo controle (G5) (Figura 2B).

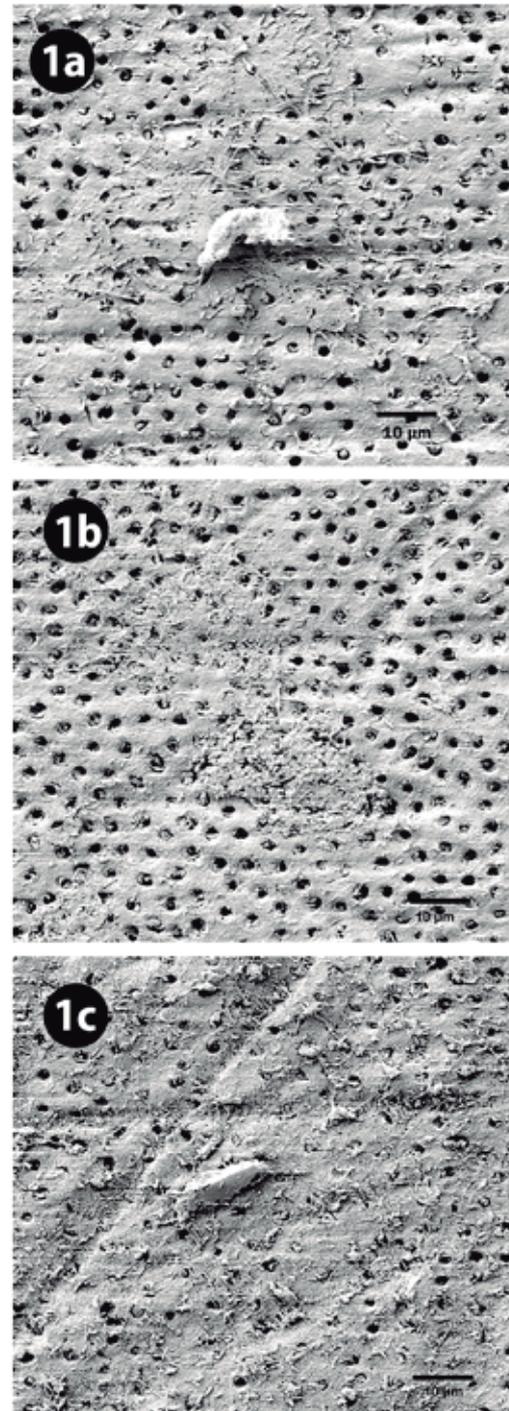


Figura 1 - Micrografias em MEV da morfologia das células MDPC-23 após aplicação de gel clareador contendo 7,5%, 20% e 35% de peróxido de hidrogênio (PH) sobre discos de dentina com 0,5 mm de espessura. (A) G1, gel com 7,5% PH – Presença de algumas células com morfologia variável aderidas à superfície pulpar do disco dentinário. Abertura dos túbulos dentinários aparente. $\times 500$; (B) G2, gel com 20% PH – Presença de fragmentos celulares com degeneração citoplasmática aderidas ao substrato do disco de dentina. $\times 500$; (C) G3, gel com 35% PH – Superfície pulpar do disco de dentina exibindo apenas fragmentos de células mortas que permaneceram aderidas ao substrato dentinário. $\times 500$.

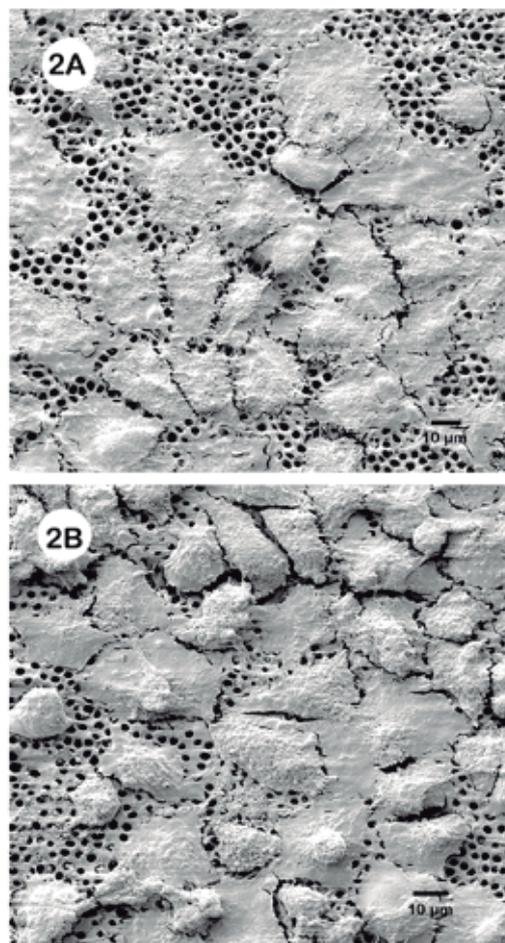


Figura 2 - Micrografias em MEV da morfologia das células MDP-23 após aplicação de gel clareador sem peróxido de hidrogênio (PH) sobre discos de dentina com 0,5 mm de espessura. (A) G4, gel sem PH: Células MDP-23 com morfologia típica, aderidas sobre a superfície de dentina. Citoplasma amplo e achatado recobrendo vários túbulos dentinários. Pequenas extensões citoplasmáticas podem ser visualizadas sendo projetadas do citoplasma, as quais são responsáveis pela aderência da célula ao substrato. X500; (B) G5, controle.

DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo demonstraram redução significativa da viabilidade das células MDP-23 para todos os grupos submetidos à aplicação dos agentes clareadores contendo PH diretamente sobre a dentina. Quando o gel sem PH foi aplicado sobre os discos de dentina, a redução da viabilidade celular foi em torno de 17%, não apresentando diferença significativa com o grupo controle, onde nenhum tratamento foi realizado. Embora não tenha sido utilizada nenhuma metodologia para detectar especificamente quais componentes do agente clareador atingiram a superfície pulpar dos discos de dentina, os resultados observados para o gel livre de PH permitem afirmar que a presença de PH no agente clareador foi o principal responsável pela citotoxicidade celular. A análise em MEV demonstrou que a redução da viabilidade celular foi mediada por uma completa desestruturação celular seguido por morte celular, uma vez que restos de componentes celulares foram observados na superfície pulpar dos discos submetidos ao clareamento.

Dias Ribeiro et al.²⁷ (2009), empregando metodologia semelhante à do presente estudo, avaliaram a viabilidade de células odontoblastóides semeadas sobre a superfície pulpar de discos

de esmalte/dentina. Os autores demonstraram que duas aplicações de 15 minutos de um gel com 35% de PH sobre o esmalte causou redução de 31,7% na viabilidade das células MDP-23. Na presente pesquisa, a redução em torno de 66% na viabilidade de células da mesma linhagem odontoblastica foi observada para o grupo submetido ao protocolo 2x 15 min 35% PH. Desta forma, ficou demonstrado que a aplicação do agente clareador diretamente sobre a superfície de dentina promove maiores danos às células pulpares, devido à maior permeabilidade deste tecido tubular, o que favorece a difusão dos componentes do gel em direção à câmara pulpar.

No presente estudo, a concentração de PH no gel clareador não exerceu influência significativa sobre a citotoxicidade transdentinária em células MDP-23. Em estudo prévio, foi observado que um gel com 35% ou 17,5% de PH aplicado por 45 minutos na superfície dental resultou em redução em torno de 93% e 83%, respectivamente, para células pulpares humanas, sem diferença significativa entre si. Neste mesmo estudo, as células em ambos os grupos apresentaram a mesma intensidade de estresse oxidativo, apesar da concentração de PH capaz de se difundir pela estrutura dental ter sido menos intensa para o gel com 17,5% PH². Desta forma, fica claro que a intensidade do estresse oxidativo mediado por altas concentrações de PH em contato com as células pulpares apresenta papel importante na toxicidade celular, independente da concentração de PH aplicada na superfície dental.

A aplicação de géis com 10 e 8% de PH é capaz de reduzir significativamente a toxicidade celular quando comparados ao gel com 35% de PH²⁸. Da mesma forma, foi demonstrado que a utilização de peróxido de carbamida, por liberar menores concentrações de peróxido de hidrogênio, desencadeia efeitos celulares menos agressivos²⁵. No estudo realizado por Lima et al.²⁵ (2010), foi avaliado o efeito citotóxico de agentes clareadores contendo 10 ou 16% de peróxido de carbamida sobre células MDP-23 semeadas na superfície pulpar de discos de dentina, de forma semelhante à empregada no presente estudo. Os autores observaram que os efeitos tóxicos foram diretamente proporcionais à concentração do agente clareador avaliado. Porém, os autores empregaram um gel clareador a base de peróxido de carbamida, o qual, quando em contato com a superfície dental, se dissocia para liberar apenas 3,5% da sua concentração total em PH, e esta liberação ocorre de forma lenta e gradual, prevenindo a penetração imediata de grandes quantidades de PH na câmara pulpar. Desta forma, acredita-se que no presente estudo a utilização de géis clareadores a base de PH na sua forma pura em um substrato permeável como a dentina pode ter determinado a penetração rápida de elevadas concentrações de PH, ocasionando efeitos citotóxicos similares para os géis clareadores avaliados, independentemente da concentração empregada (7,5%, 20% ou 35%).

De acordo com Duque et al.¹⁸ (2016), a espessura do substrato dental apresenta papel fundamental na difusão de componentes tóxicos dos agentes clareadores pela estrutura dental, e na consequente toxicidade sobre as células pulpares. O efeito da espessura dental sobre a resposta do tecido pulpar de dentes humanos frente ao clareamento foi previamente demonstrado em estudos histopatológicos. Quando um gel com 38% de PH foi aplicado por 3x15 minutos sobre incisivos inferiores hígidos de

pacientes jovens (espessura de dentina = $1,82 \pm 0,08$ mm), foi observada intensa reação inflamatória, associada a necrose superficial em cerca de 75% dos dentes, enquanto que o tecido pulpar de pré-molares jovens (espessura de dentina = $3,10 \pm 0,11$ mm), submetidos à mesma terapia clareadora, apresentaram características histopatológicas similares aos dentes não clareados. Neste experimento, a sensibilidade dental foi relatada apenas nos incisivos inferiores clareados. Em outra investigação realizada recentemente *in vivo*⁹, avaliou-se o efeito do protocolo tradicional (35% 3x15 minutos) sobre o tecido pulpar de incisivos inferiores de pacientes jovens ($20,1 \pm 4,3$ anos) e idosos ($58,2 \pm 4,3$ anos). Necrose tecidual foi detectada em cerca de 60% dos incisivos de indivíduos idosos, cuja espessura média de dentina foi de $1,99 \pm 0,10$ mm, em comparação com 100% dos incisivos inferiores de pacientes jovens, os quais apresentaram espessura dentinária em média de $1,77 \pm 0,08$ mm, sendo que a extensão da área de necrose foi consideravelmente maior nos dentes provenientes dos indivíduos jovens.

Estudos clínicos tem demonstrado que a sensibilidade dental é limitada aos dentes anteriores da arcada dental, sendo que a prevalência e intensidade deste efeito adverso apresenta uma correlação negativa com a espessura de esmalte/dentina do elemento dental submetido ao clareamento¹²⁻¹⁴. A seguinte ordem de susceptibilidade foi encontrada: incisivos inferiores > incisivos laterais superiores > incisivos centrais superiores > caninos^{8,12-14}. Assim, os efeitos adversos pós-clareamento são mais intensos nos dentes com menor espessura de esmalte/dentina.

O contato de agentes clareadores diretamente com a dentina, mesmo aqueles com baixa concentração de PH, tal como 7,5%, é capaz de resultar em danos celulares intensos, comparáveis àqueles causados por géis que contém altas concentrações de PH, tais como 20% e 35% de PH. Portanto, a aplicação desses agentes deveria ser evitada em áreas com exposição de dentina, como por exemplo, margens restauradoras defeituosas, áreas de erosão, abfração e atrição e áreas de recessão gengival. É extremamente importante que seja realizado um minucioso exame clínico antes da utilização de agentes clareadores para que áreas de exposição dentinária sejam detectadas e adequadamente protegidas.

CONCLUSÃO

Considerando-se as limitações do presente estudo *in vitro*, os resultados demonstraram que agentes clareadores são capazes de se difundir através de uma barreira dentinária de 0,5 mm de espessura e mesmo em baixas concentrações de PH podem produzir efeitos tóxicos irreversíveis às células pulpares. Desta forma, o clareamento dental deve ser evitado em pacientes que apresentem dentes com áreas de exposição dentinária até que essas áreas sejam devidamente protegidas.

AGRADECIMENTOS

Esta pesquisa foi parcialmente financiada pela FAPESP (2009/54315-7) e CNPq (PQ: 301291/2010-1).

REFERÊNCIAS

01. Kawamoto K, Tsujimoto Y. Effect of the hydroxyl radical and hydrogen peroxide on tooth bleaching. *J Endod*. 2004; 30(1): 45-50.
02. Soares DG, Basso FG, Hebling J, de Souza Costa CA. Concentrations of

and application protocols for hydrogen peroxide bleaching gels: effects on pulp cell viability and whitening efficacy. *J Dent*. 2014; 42(2): 185-98.

03. Soares DG, Basso GB, Pontes ECV, Garcia LFR, Hebling J, Souza Costa CA. Effective tooth-bleaching protocols capable of reducing H₂O₂ diffusion through enamel and dentine. *J Dent*. 2014; 42(3): 351-8.
04. Duque CC, Soares DG, Basso FG, Hebling J, de Souza Costa CA. Bleaching effectiveness, hydrogen peroxide diffusion, and cytotoxicity of a chemically activated bleaching gel. *Clin Oral Investig*. 2014; 18(6): 1631-7.
05. Gökay O, Mujdeci A, Algin E. *In vitro* peroxide penetration into pulp chamber from newer bleaching products. *Int Endod J*. 2005; 38(8): 416-20.
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): 1074-77.
07. Cecarini V, Gee J, Fioretti E, Amici M, Angeletti M, Eleuteri AM, Keller JN. Protein oxidation and cellular homeostasis: Emphasis on metabolism. *Biochim Biophys Acta*. 2007; 1773(2): 93-104.
08. De Souza Costa CA, Riehl H, Kina JF, Sacono NT, Hebling J. Human pulp responses to in-office tooth bleaching. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology & Endodontics*. 2010;109(4): 59-64.
09. Roderjan DA, Stanislawczuk R, Hebling J, de Souza Costa CA, Soares DG, Reis A, Loguercio AD. Histopathological features of dental pulp tissue from bleached mandibular incisors *J Mater Sci Eng B*. 2014; 4: 178-85.
10. Roderjan DA, Stanislawczuk R, Hebling J, Costa CA, Reis A, Loguercio AD. Response of human pulps to different in-office bleaching techniques: preliminary findings. *Braz Dent J*. 2015; 26(3): 242-48.
11. Amengual J, Forner L. Dentine hypersensitivity in dental bleaching: case report. *Minerva stomatol*. 2009; 58(4): 181-85.
12. De Almeida LC, de Souza Costa CA, Riehl H, dos Santos PH, Sundfeld RH, Briso AL. Occurrence of sensitivity during at-home and in-office tooth bleaching therapies with or without use of light sources. *Acta Odontol Latinoam*. 2012; 25(1): 3-8.
13. Bonafé E, Bacovis CL, Iensen S, Loguercio AD, Reis A, Kossatz S. Tooth sensitivity and efficacy of in-office bleaching in restored teeth. *J Dent*. 2013; 41(4): 363-9.
14. Bonafé E, Loguercio AD, Reis A, Kossatz S. Effectiveness of a desensitizing agent before in-office tooth bleaching in restored teeth. *Clin Oral Investig*. 2014; 18(3): 839-45.
15. Ozcan M, Abdin S, Sipahi C. Bleaching induced tooth sensitivity: do the existing enamel craze lines increase sensitivity? A clinical study. *Odontology*. 2014; 102(2):197-202.
16. 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.
17. Briso ALF, Lima APB, Gonçalves RS, Gallinari MO, Dos Santos PH. Transenamel and Transdental Penetration of Hydrogen Peroxid Applied to Cracked or Microabraded Enamel. *Operative Dentistry*, 2014, 39(2): 166-73.
18. Duque CCO. Influência da espessura do substrato dental sobre a eficácia clareadora e citotoxicidade de diferentes protocolos de clareamento [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2016.
19. Pashley DH, Andriga HJ, Derkson GD, Derkson ME and Kalathoor SR. Regional variability in permeability of human dentine. *Arch Oral Biol*. 1987; 32(7): 519-23.

20. Hanks CT, Fat JC, Wataha JC and Corcoran JF. Cytotoxicity and dentin permeability of carbamide peroxide and hydrogen peroxide vital bleaching materials, in vitro. *J Dent Res.* 1993; 72(5): 931-38.
21. Gökay O, Yılmaz F, Akin S, Tunçbilek M and Ertan R. Penetration of the pulp chamber by bleaching agents in teeth restored with various restoratives materials. *J Endod.* 2000; 26(2): 92-4.
22. Hanks CT, Diehl ML, Craig RG, Makinen PK and Pashley DH. Characterization of the "in vitro pulp chamber" using the cytotoxicity of phenol. *J Oral Pathol Med.* 1989; 18(2): 97-107.
23. Costa CAS and Hanks CT. Capacity of L 929 and BALB/C 3T7 fibroblasts to survive on human dentin discs. *Braz Endod J.* 1998; 3: 7-13.
24. Outhwaite WC, McKenzie DM and Pashley DH. A versatile split-chamber device for studying dentin permeability. *J Dent Res.* 1974; 53(6): 1503.
25. Lima AF, Lessa FC, Mancini MN, Hebling J, Costa CA, Marchi GM. 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): 70-6.
26. Hanks CT, Fang D, Sun Z, Edwards CA, Butler WT. Dentin-specific proteins in MDPC-23 cell line. *Eur J Oral Sci.* 1998; 106 Suppl 1:260-6.
27. Dias Ribeiro AP, Sacono NT, Lessa FCR, Nogueira I, Coldebella CR, Hebling J, de Souza Costa CA. Citotoxic effect of a 35% hydrogen peroxide bleaching gel on odontoblast-like MDPC-23. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2009; 108(3): 458-64.
28. Soares DG, Basso FG, Hebling J, de Souza Costa CA. Immediate and late analysis of dental pulp stem cells viability after indirect exposition to alternative in-office bleaching strategies. *Clin Oral Investig.* 2015; 19(5): 1013-20.

ABSTRACT

Objective: To evaluate the cytotoxic effects of bleaching gels with different concentrations of hydrogen peroxide (HP) on odontoblast-like cells, when applied directly on dentin. **Material and method:** Fifty dentin discs (0.5 mm thick) were adapted in artificial pulp chambers (APC) and MDPC-23 cells were seed on the pulpal side. The discs were divided into 5 groups (n=10): G1: HP 7.5%; G2: HP 20%; G3: HP 35%; G4: gel with no HP; and G5: no treatment (control). The gels were applied on the occlusal side of the discs for 2x of 15 min. Cellular viability (MTT assay) and morphology (SEM) were analyzed immediately after the bleaching procedure. Data of cellular viability were submitted to Kruskal-Wallis and Mann-Whitney tests ($\alpha=0.05$). **Results:** Significant reduction in cellular viability was seen for all HP

concentrations in comparison to the control (G5). However, no statistical significant difference was seen among the concentrations of HP. Likewise, there was no statistical difference between the control group (G5) and the group where the gel with no HP was applied (G4). **Conclusion:** All HP concentrations caused severe cytotoxic effects on the odontoblast-like cells when applied directly on dentin. However, the intensity of the cytotoxic effect was not influenced by the concentration of the HP included in the bleaching gel. **Clinical significance:** Within the limitations of this in vitro study, the results strongly indicate that dental bleaching procedures should not be performed directly on areas of dentin exposure.

Keywords: Dental bleaching; Dentin; Dentin permeability; Cytotoxicity; Hydrogen peroxide; Odontoblasts.

AUTOR CORRESPONDENTE:

Carlos Alberto de Souza Costa
Departamento de Fisiologia e Patologia
Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP
Rua Humaitá, 1680 - Centro. CEP: 14801-903,
Araraquara, SP, Brasil
Phone: +55-16-3301-6477. Fax: 55-16-3301-6488.
e-mail address: casouzac@foar.unesp.br