

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA – DOUTORADO

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: DENTÍSTICA RESTAURADORA

DOUGLAS AUGUSTO RODERJAN

**AVALIAÇÃO DAS DIFERENTES TÉCNICAS DE CLAREAMENTO DENTAL
DE CONSULTÓRIO: EFETIVIDADE, SENSIBILIDADE PÓS-TRATAMENTO E
EFEITOS SOBRE O COMPLEXO DENTINO-PULPAR.**

PONTA GROSSA

2012

DOUGLAS AUGUSTO RODERJAN

**AVALIAÇÃO DAS DIFERENTES TÉCNICAS DE CLAREAMENTO DENTAL
DE CONSULTÓRIO: EFETIVIDADE, SENSIBILIDADE PÓS-TRATAMENTO E
EFEITOS SOBRE O COMPLEXO DENTINO-PULPAR.**

**Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Odontologia - Doutorado, Área de Concentração
– Dentística Restauradora, da Universidade
Estadual de Ponta Grossa – PR, como requisito à
obtenção do título de Doutor.**

Orientador: Prof Dr Alessandro Dourado Loguercio

PONTA GROSSA

2012

Catálogo na Fonte
Elaborada pelo Setor Tratamento da Informação BICEN/UEPG

Roderjan, Douglas Augusto
R688a Avaliação das diferentes técnicas de clareamento dental de consultório : efetividade, sensibilidade pós-tratamento e efeitos sobre o complexo dentino-pulpar / Douglas Augusto Roderjan. Ponta Grossa, 2012
137 f. : il ; color.

Tese (Doutorado em Odontologia – área de concentração : Dentística Restauradora), Universidade Estadual de Ponta Grossa.
Orientador: Prof. Dr. Alessandro Dourado Loguercio.

1. Clareamento dentário. 2. Polpa dentária. 3. Peróxido de hidrogênio.
I. Loguercio, Alessandro Dourado. II. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Doutorado em Odontologia. III. T.

CDD: 617.6

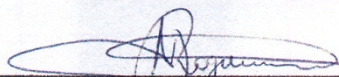
DOUGLAS AUGUSTO RODERJAN

**AVALIAÇÃO DAS DIFERENTES TÉCNICAS DE CLAREAMENTO DENTAL
DE CONSULTÓRIO: EFETIVIDADE, SENSIBILIDADE PÓS-TRATAMENTO E
EFEITOS SOBRE O COMPLEXO DENTINO-PULPAR**

**Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Odontologia - Doutorado, Área de Concentração
– Dentística Restauradora, da Universidade
Estadual de Ponta Grossa – PR, como requisito à
obtenção do título de Doutor.**

Orientador: Prof Dr Alessandro Dourado Loguercio

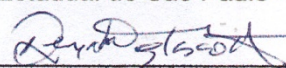
BANCA EXAMINADORA



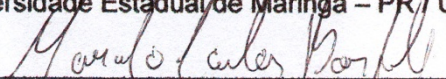
Prof Dr Alessandro Dourado Loguercio
Universidade Estadual de Ponta Grossa – PR / UEPG



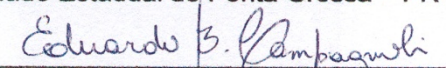
Prof Dr Carlos Alberto de Souza Costa
Universidade Estadual de São Paulo - SP / UNESP



Profa Dra Renata Corrêa Pascotto
Universidade Estadual de Maringá – PR / UEM



Prof Dr Marcelo Carlos Bortoluzzi
Universidade Estadual de Ponta Grossa – PR / UEPG



Prof Dr Eduardo Baumli Campagnoli
Universidade Estadual de Ponta Grossa – PR / UEPG

Ponta Grossa, 13 de Dezembro de 2012

“Só Deus conhece o caminho para a sabedoria, somente Ele sabe onde ela se encontra, pois Ele contempla os confins do universo e vê tudo o que existe debaixo do céu. Quando fixou um peso para o vento e definiu a medida das águas, quando deu uma lei para a chuva e uma rota para o relâmpago e o trovão, então Ele a observou e avaliou, e sondou e estabeleceu. E disse ao homem: A sabedoria consiste em temer ao Senhor, e a inteligência está em afastar-se do mal”.

Jó 28,23-28

DEDICO ESTE TRABALHO

A DEUS

Que sempre iluminou minha vida, guiou meus caminhos e me deu força, coragem e determinação para lutar pelos meus sonhos.

A minha esposa, companheira e amiga CLEIDE MALUCELLI RODERJAN

Na vida todos temos um segredo inconfessável, um arrependimento irreversível, um sonho inalcançável e um amor inesquecível.

Aos meus filhos, FLÁVIA E DOUGLAS FILHO

Não me canso de olhá-los, jamais me cansarei, pois tenho vocês sempre comigo no meu coração, nas minhas orações, nos meus sonhos.

A minha Mãe ZENY CRUZ RODERJAN (*in memoriam*)

Minha primeira mestra, responsável por tudo aquilo que me transmitiu e por todos os valores que só se adquirem com uma boa educação.
Professora da maior Universidade, a escola da vida.

A minha Sogra DIAHYR CARNEIRO MALUCELLI

Meu porto seguro, responsável por sempre me animar e me proporcionar momentos agradáveis e reconfortantes. Obrigado por fazer parte da minha vida.

Amo vocês

AGRADECIMENTOS

Ao meu Orientador, **Professor Doutor Alessandro Dourado Loguercio**, pela orientação segura e competente, pela sua compreensão, inestimável ajuda e incentivo em todos os momentos e, sobretudo, pelo fortalecimento de nossa amizade.

A Universidade Estadual de Ponta Grossa, na pessoa de seu **Magnífico Reitor Professor Doutor João Carlos Gomes**, pela iniciativa frente aos Cursos de Pós-Graduação.

A Coordenadora do Programa de Pós-Graduação – Doutorado, **Professora Doutora Osnara Mongruel Gomes**, pela sua dedicação, determinação e reconhecida capacidade administrativa.

Ao Diretor do Setor de Ciências Biológicas e da Saúde, **Professor Doutor Flávio Kalinoski**; ao Chefe do Departamento de Odontologia, **Professor Fábio André dos Santos** e demais professores desse Departamento, pelo incentivo e amizade dedicada.

Aos **Professores Doutores Eduardo Bauml Campagnoli e Marcelo Carlos Bortoluzzi** pela força, pelo incentivo e pela vibração em relação a essa jornada.

Aos colegas de turma de Doutorado 2009, **Zuk, Alessandro, Christian, Márcio, Ana Chibinski, Lissandra, Gislaine, Michelli, Christiana, Ana Isidoro e Vânia** que compartilharam dos mesmos sonhos e objetivos.

Ao meu amigo **Rodrigo Stanislawczuk Grande**. As pessoas entram em nossas vidas por acaso, mas não é por acaso que elas ficam.

Aos meus pacientes, que na necessidade de tratamento odontológico, na confiança e no espírito de colaboração científica proporcionaram possibilidades da realização desse trabalho.

A Secretária do Programa de Pós-Graduação, **Senhora Morgana das Graças Procz dos Santos**, pelos préstimos, dedicação e amizade.

E a todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a execução desse trabalho. **Nosso muito obrigado!!!**

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

NOME: Douglas Augusto Roderjan

NOME EM CITAÇÕES BIBLIOGRÁFICAS: RODERJAN, D.A.

SEXO: masculino

FILIAÇÃO: Cleon Carlos Roderjan e Zeny Cruz Roderjan

NASCIMENTO: 26/07/1952 – Ponta Grossa/Paraná – Brasil

ENDEREÇO RESIDENCIAL: Rua Saldanha da Gama, 595 – Órfãs,
Ponta Grossa/Paraná/Brasil - 84015-135, 042-32238023

ENDEREÇO PROFISSIONAL: Universidade Estadual de Ponta Grossa,
Setor de Ciências Biológicas e da Saúde, Departamento de Odontologia

Av, Gal. Carlos Cavalcanti, s/nº - Uvaranas, Ponta Grossa/Paraná/Brasil
84030-000, 042-32203104

ENDEREÇO ELETRÔNICO: douglas_roderjan@yahoo.com.br

FORMAÇÃO ACADÊMICA:

Graduado em Odontologia pela Universidade Estadual de Ponta
Grossa/Paraná/Brasil em 1975.

Especializado em Endodontia pela Pontifícia Universidade Católica do
Paraná, PUC, Curitiba/Paraná em 1986.

Especializado em Dentística Restauradora pela Associação Brasileira de Odontologia Secção do Paraná, Sub Secção de Ponta Grossa/Paraná em 1994.

Mestre em Odontologia pela Universidade Estadual de Ponta Grossa/Paraná/Brasil em 2004.

ATUAÇÃO PROFISSIONAL:

Cirurgião-Dentista desde 1975, atuando nas especialidades de Endodontia e Dentística Restauradora, com clínica odontológica situada a Rua Theodoro Rosas, 1001, 2º andar, 042-32246589 em Ponta Grossa/Paraná/Brasil.

Professor Assistente “D”, ministrando aulas na Disciplina de Endodontia do Curso de Odontologia da Universidade Estadual de Ponta Grossa/Paraná/Brasil, desde 1988.

Roderjan DA. Avaliação das diferentes técnicas de clareamento dental de consultório: Efetividade, sensibilidade pós-tratamento e efeitos sobre o complexo dentino-pulpar. [Tese de Doutorado]. Ponta Grossa: Universidade Estadual de Ponta Grossa UEPG; 2012.

RESUMO

O uso de gel clareador a base de peróxido de hidrogênio (PH) com menor concentração, diminuindo o número de vezes a ser aplicado ou adicionando cálcio na composição pode reduzir a quantidade de PH que atinge a câmara pulpar durante o clareamento dentário. Entretanto, poucos estudos sobre a resposta pulpar de dentes humanos *in vivo* têm sido avaliados. Os objetivos deste estudo foram avaliar *in vivo* a resposta de polpas de incisivos inferiores humanos sadios frente ao clareamento em consultório. No experimento 1, géis clareadores com diferentes concentrações de PH (Whiteness HP Maxx 35 e 20%) foi avaliado. No experimento 2, o gel de PH foi aplicado por três vezes de 15 min ou em uma única aplicação de 45 min usando um gel sem (Whiteness HP Maxx) e com (Whiteness HP Blue) cálcio. No experimento 3, a resposta pulpar frente ao clareamento de consultório foi verificada em dentes de pacientes jovens e idosos. Em todos os experimentos os agentes clareadores foram aplicados sobre a superfície vestibular dos incisivos humanos inferiores e após 2 dias do clareamento foram extraídos. O tecido pulpar da porção coronária foi submetido à análise histológica. Também foram avaliadas a efetividade do clareamento e a sensibilidade dental (sim/não). Clareamento médio de 2 a 3 unidades de escala vita foi observado em todos os dentes clareados assim como presença de sensibilidade, fato que não ocorreu nos

grupos controle (não clareados). Para praticamente todas as técnicas de clareamento utilizadas, independentemente se em dentes de pacientes jovens ou idosos, foi observada necrose parcial do tecido pulpar coronário associado à deposição de dentina reacional. Com a aplicação do Whiteness HP Blue ocorreu menor resposta pulpar, com pequenas áreas de necrose em um reduzido número de dentes. Pode-se concluir que o clareamento de consultório com géis de PH de 20 e 35% aplicados em três vezes de 15 min ou em única de 45 min em incisivos inferiores humanos causam danos pulpares, caracterizados por necrose parcial do tecido pulpar coronário associada à deposição de dentina reacional, tanto em dentes de pacientes jovens como de pacientes idosos. Exceção deve ser feita a aplicação de um PH a 35% com cálcio que demonstrou um menor padrão de dano pulpar.

Palavras-chave: Clareamento dentário. Peróxido de hidrogênio. Polpa dentária.

Roderjan DA. Assessment of different in-office tooth bleaching techniques: Effectiveness, sensitivity post-treatment and effects on the pulp-dentin complex. [PhD Thesis]. Ponta Grossa: Universidade Estadual de Ponta Grossa UEPG; 2012.

ABSTRACT

The use of bleaching gels with low hydrogen peroxide (HP) concentration, as well as the reduction of application times or its association with calcium-containing agents may be clinical approaches to reduce the amount of HP that reaches the pulp tissue to cause local damage. However, only a few data have been published about the pulp response of human teeth subjected to in-office bleaching protocols. Therefore, the objectives of this study were to evaluate the *in vivo* pulp response of human lower incisors after in-office bleaching. In the experiment 1, a bleaching gel with two different HP concentrations (Whiteness HP Maxx 20 and 35%) as evaluated. In the experiment 2, the HP was applied in three 15-min applications and in a single 45-min application using a calcium-containing (Whiteness HP Blue) or calcium-free (Whiteness HP Maxx) HP agent. In the experiment 3, the pulp response of human incisors of young and older patients was evaluated after in-office bleaching with 35% HP. In all experiments, the bleaching agents were applied on the buccal surface of lower human incisors and two days after the procedure they were extracted. The pulp tissue from the crown portion of all teeth was histologically evaluated and the data subjected to appropriate statistical analysis. The bleaching efficacy and the tooth sensitivity (yes/no) were also evaluated. In all bleached teeth, a whitening of 2 to 3 shade guide units were observed and all patients reported tooth pain;

findings not observed in the control (non-bleached) teeth. In general, all in-office bleaching protocols regardless of the tooth age showed partial necrosis of the crown pulp tissue associated with a deposition of reactionary dentin. Only the application of the Whiteness HP Blue 35% showed better pulp response with reduced areas of pulp necrosis in a reduced number of teeth. It was concluded that the in-office bleaching with HP 20 or 35% of human lower incisors applied in three 15-min or in a single 45-min applications produced pulp damage with partial tissue necrosis and deposition of reactionary dentin both in young and older teeth. Only in-office bleaching with a 35% calcium-containing HP showed reduced pulp damage.

Keywords: Dental bleaching. Hydrogen peroxide. Pulp tissue.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Incisivo inferior hígido (31) indicado para exodontia por razões ortodônticas.....	09
Figura 2- Escala de cores Vita Lumin®, Vita Zahnfabrik, Bad Säckingen, Alemanha. Organizada por ordem de luminosidade. Cor da escala (a) e valor numérico (b) correspondente. Foto cedida pela Doutoranda Márcia Fernanda de Rezende Siqueira (Dentística, UEPG).....	11
Figura 3- Avaliação inicial da cor.. ..	11
Figura 4- Teste de sensibilidade com Endo-Frost®, Roeko, Alemanha com auxílio de cotonete.....	12
Figura 5- Profilaxia sendo realizada com escova Robinson e Pasta branco de Espanha	16
Figura 6- Barreira gengival fotopolimerizável em posição.....	16
Figura 7- Whiteness HP Maxx® 35%, FGM produtos odontológicos, Joinville, SC, Brasil.....	17
Figura 8- PH 20%, manipulado especialmente pelo fabricante (FGM produtos odontológicos, Joinville, SC, Brasil) para este estudo.....	17
Figura 9- a: 3 gotas de PH, b: 1 gota de espessante, c: mistura dos produtos do agente clareador.....	19
Figura 10- Aplicação do gel.....	19
Figura 11- Movimentação do produto com sonda exploradora.....	20
Figura 12- Lavagem abundante e aspiração do produto.....	20

Figura 13- Nova avaliação de cor.....	21
Figura 14- a: Anestésico tópico Benzotop®, seringa Carpule, agulha curta Septojet® e anestube de citocaína 3%; b: procedimento de anestesia tópica; c: procedimento de anestesia infiltrativa.....	22
Figura 15- Exodontia propriamente dita.....	22
Figura 16- a: elemento dentário extraído; b: realização de sutura.....	23
Figura 17- Corte da raiz do dente com ponta diamantada nº 2200.....	23
Figura 18- a: parte coronária separada da radicular; b: parte coronária colocada em solução de formalina tamponada a 10%.....	24
Figura 19- Preparo do gel de Whiteness HP Blue®, FGM produtos odontológicos, Joinville, SC, Brasil	31
Figura 20- Aplicação única do gel e após o tempo de 45 minutos para o HP Blue 35%, aspirando com cânula endodôntica e lavando com água abundantemente.....	31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Grupos, técnicas e amostra - art.1	15
Tabela 2- Composição do produto, técnica e modo de aplicação- art.1	18
Tabela 3- Escores utilizados durante o exame histológico para cada critério avaliado (resposta inflamatória celular, desorganização tecidual e formação de dentina reacional) – art. 1.....	26
Tabela 4- Grupos, técnicas e amostra- art. 2.....	29
Tabela 5- Composição do produto, técnica e modo de aplicação- art.2.....	30
Tabela 6- Grupos, técnicas e amostra - art.3.....	32
Tabela 7- Composição do produto, técnica e modo de aplicação- art.3.....	33

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

PC	peróxido de carbamida
EUA	Estados Unidos da América
%	simbolo de porcentagem
PH	peróxido de hidrogênio
pH	potencial hidrogeniônico
COEP	Comitê de Ética em Pesquisa para Estudos em Seres humanos
UEPG	Universidade Estadual de Ponta Grossa
B1,A1,B2,D2,A2,C1,C2,D4,A3,D3,B3,A3.5,B	código de cores da escala Vita
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
[GC]	grupo controle
[G35]	3 aplicações de 15 minutos de PH 35%
[G20]	3 aplicações de 15 minutos de PH 20%
n	número da amostra
mm	milímetros
UI/ml	unidade internacional por mililitro
ml	mililitros
JAC	junção amelocementária
nº	número
p.a	pró-análise
g	grama
UNESP	Universidade do Estado de São Paulo
µm	micrometro
H/E	hematoxilina/eosina
MO	microscópio ótico
Δ VUC	variação da unidade de cor
α	nível de significância
[SC 3-15]	Whiteness HP Maxx sem cálcio em 3 aplicações de 15 minutos
[SC 1-45]	Whiteness HP Maxx sem cálcio em aplicação única de 45 minutos

[CC 1-45] Whiteness HP Blue 35 com cálcio em aplicação única de 45 minutos

Pg página

ED espessura dentinária

SD sensibilidade dentária

OH⁻ íons hidroxil

[GJ] grupo jovem

[GI] grupo idoso

[GCJ] grupo controle jovem

[GCI] grupo controle idoso

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL	01
2	PROPOSIÇÃO	06
	2.1 Artigo nº 1	06
	2.2 Artigo nº 2	07
	2.3 Artigo nº 3	08
3	MATERIAL E MÉTODOS	09
	3.1 MATERIAL E MÉTODOS DOS ARTIGOS Nº 1 E Nº 2	09
	3.1.1 Seleção dos dentes	09
	3.1.2 Termo de consentimento livre e esclarecido.....	10
	3.1.3 Critérios de inclusão.....	10
	3.1.4 Critérios de exclusão.....	12
	3.2 MATERIAL E MÉTODOS DO ARTIGO Nº 3.....	13
	3.2.1 Seleção dos dentes.....	13
	3.2.2 Termo de consentimento livre e esclarecido.....	13
	3.2.3 Critérios de inclusão	14
	3.2.4 Critérios de exclusão.....	14
4	DELINEAMENTO DOS ESTUDOS	15
	4.1 Artigo nº 1.....	15
	4.1.1 Parte clínica	15
	4.1.2 Parte cirúrgica	21
	4.1.3 Parte histopatológica.....	25
	4.1.4 Análise estatística	27
	4.2 Artigo nº 2	28
	4.2.1 Parte clínica	28
	4.3 Artigo nº 3.....	32
	4.3.1 Parte clínica.....	32
	4.3.2 Mensuração da espessura dentinária.....	33
5	ARTIGOS	35
	5.1 Artigo nº 1	35
	5.2 Artigo nº 2	56
	5.3 Artigo nº 3.....	83
6	DISCUSSÃO GERAL	107
7	CONCLUSÃO	113
8	REFERÊNCIAS	114
9	ANEXOS	120

ANEXOS

Anexo 1 – Comitê de Ética em Pesquisa para Estudos em Seres Humanos (COEP)	122
Anexo 2 – Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE)	124
Anexo 3 – Recomendações do fabricante do Whiteness HPmaxx.....	126
Anexo 4 – Declaração da UNESP	128
Anexo 5 - Recomendações do fabricante do Whiteness HP BLUE.....	130
Anexo 6 - Ficha clinica periodontal	132
Anexo 7- Carta de submissão ao Clinical Oral Investigations	135
Anexo 8- Carta de submissão ao Journal of Oral Pathology and Medicine	137

1 INTRODUÇÃO GERAL

Clareamento dental é um dos procedimentos estéticos odontológicos mais requisitados na atualidade, visto que a cor do dente é considerada o fator mais importante no que diz respeito a estética dentária e, geralmente, é muito solicitado por pacientes que desejam um sorriso mais agradável (Samorodnitzki-Naveh et al., 2007; Tin Oo et al., 2011).

Apesar de ser uma técnica muito antiga, somente após a introdução do peróxido de carbamida na técnica de clareamento noturno para dentes vitais (Haywood et al., 1989) é que houve aumento na procura por este procedimento de clareamento nas últimas décadas. Além disso, houve também grande procura por tratamentos de clareamento em consultório (Barghi, 1998; Perdigão et al., 2004). Pesquisa publicada nos EUA apontou que 33% dos cirurgiões-dentistas, atualmente realizam clareamento em consultório (CRA, 2000). Isto está relacionado ao fato de que os pacientes desejam resultados imediatos, em grande parte influenciados pela mídia, mas também por não se sentirem confortáveis com o uso de moldeiras (Barghi, 1998; Perdigão et al., 2004).

Clareamento dental é um procedimento seguro, conservador e eficaz (Haywood, 2000; Leonard et al., 2001), geralmente realizado com géis contendo peróxido de hidrogênio (PH) ou peróxido de carbamida (PC) em diferentes concentrações, podendo ser realizado em casa com a supervisão do dentista ou no consultório pelo clínico, com ou sem ativação de luz ou

por meio de uma combinação destas duas modalidades (Dahl, Pallesen, 2003; Perdigão, 2010).

Porém, apesar da sua eficácia (Zekonis et al., 2003; Auschill et al., 2005; Marson et al., 2008; Tay et al., 2009; Bernardon et al., 2010; Salem, Osman, 2011), o clareamento em consultório apresenta alguns efeitos colaterais tais como: irritação da mucosa gengival, alteração da superfície do esmalte, efeitos sobre restaurações, genotoxicidade, carcinogenicidade e toxicidade (Dahl, Pallensen, 2003), sendo a sensibilidade dentária o efeito colateral mais comum. Estudos clínicos estimam que 55% a 100% dos pacientes apresentam sensibilidade dentária após clareamento, com intensidade que varia de leve a severa (Marson et al., 2008; Tay et al., 2009; Bernardon et al., 2010; Kossatz et al., 2011; Reis et al., 2011; Salem, Osman, 2011).

Embora a etiologia desse efeito colateral ainda não tenha sido totalmente esclarecida, parece que se deve a difusão do PH através do esmalte e dentina durante o clareamento, chegando até a câmara pulpar (Cooper et al., 1992; Hanks et al., 1993; Benetti et al., 2004; Sulieman et al., 2004; Gökyay et al., 2005), podendo levar a irritação e inflamação reversível do tecido pulpar.

Quando se trata de clareamento em consultório, efeitos mais graves têm sido observados. Danos às células pulpares, especialmente aos odontoblastos, foram demonstrados por vários estudos *in vitro* (Trindade et al., 2009; Coldebella et al., 2009; Dias Ribeiro et al., 2009). Estudos recentes de Costa et al. (2010) mostraram a presença de necrose pulpar e

calcificações distróficas em incisivos centrais inferiores humanos, após 3 aplicações de 15 minutos cada de PH a 38%.

Agentes clareadores utilizados na técnica de clareamento em consultório são normalmente aplicados nas superfícies dos dentes, deixado em repouso durante algum tempo (geralmente 15 minutos) e em seguida o produto é renovado por mais 3 a 4 vezes na mesma consulta clínica, dependendo da marca do gel de clareamento utilizado. Sabendo-se que a difusão do PH através do esmalte depende da concentração do agente de clareamento, do período de tempo que este ficará em contato com a dentina (Cooper et al., 1992; Hanks et al., 1993; Benetti et al., 2004; Sulieman et al., 2004), bem como com o número de vezes que o gel é trocado em uma mesma sessão clínica e considerando-se que os géis mantêm efetividade após uma hora (Al-Qunaian et al., 2003), pode-se especular que uma única aplicação do gel por um período de tempo de 45 minutos pode produzir resultados semelhantes de clareamento comparado aquela técnica onde se utiliza 3 ou mais aplicações de 15 minutos, conduzindo a menos tempo de cadeira e reduzindo custos, visto que, menos material seria dispensado ao clareamento. Além disso, diminuiria a probabilidade de eventuais riscos de queimaduras de tecidos moles pelo fato de o material ser colocado uma única vez (Reis et al., 2011). Além disso, a aplicação única do produto também poderia reduzir a quantidade de PH que atinge a câmara pulpar causando menos danos para as células pulpares do que três ou mais aplicações de 15 minutos. Frente a estas questões, pesquisadores avaliaram a eficácia do clareamento e sensibilidade dentária realizando uma

única aplicação de 45 minutos ao invés de 3 aplicações de 15 minutos cada (Matis et al., 2009; Reis et al., 2011). Matis et al. (2009) demonstraram haver mais efetividade de clareamento quando foi aplicado o agente clareador por 3 vezes de 15 minutos comparado a aplicação única por 40 minutos. Reis et al. (2011) sugerem que no clareamento em consultório, utilizando-se PH a 35%, deve-se utilizar a técnica de aplicação de 3 vezes de 15 minutos porque resultados apontaram que na aplicação única de 45 minutos ocorreu redução da eficácia do clareamento em 86,7% e leve aumento da intensidade da sensibilidade dentária.

Vale salientar que, produtos recentemente lançados no mercado odontológico, apesar de manterem a mesma concentração do agente clareador tiveram adicionados a sua composição agentes desensibilizantes, tais como o fosfato de cálcio amorfo (Giniger et al., 2005) ou gluconato de cálcio (Kossatz et al., 2012). Freire et al.(2009) verificaram que a temperatura de estocagem destes produtos afeta significativamente o pH. Price et al. (2000) avaliaram pH de algumas marcas comerciais de agentes clareadores utilizados em clareamento em consultório e verificaram média de pH 3,67 a 6,53, sugerindo maiores investigações no sentido de minimizar os efeitos adversos provocados pelo baixo pH, como por exemplo, a adição de pequenas quantidades de cálcio na composição química destes produtos.

Entretanto, a resposta pulpar da técnica de aplicação de PH em uma única vez de 45 minutos, associada ou não a presença de desensibilizantes, ainda não foi avaliada.

Todas estas preocupações têm levado alguns fabricantes a lançarem agentes clareadores para uso em consultório, com baixa concentração de PH, uma vez que estudos clínicos mostram que nesta concentração produzem menor risco de sensibilidade dentária, embora também produzam menor padrão de efetividade de clareamento (He et al., 2012). Novamente a resposta pulpar aplicando PH em baixas concentrações também não foi avaliada.

Costa et al. (2010) relataram que danos pulpares produzidos por PH são dependentes do tipo de dente onde o produto é aplicado. Os resultados já anteriormente mencionados foram observados em polpas de incisivos centrais inferiores submetidos à aplicação de PH a 38% em clareamento em consultório, mas esta mesma resposta não foi observada nas polpas de pré-molares. Os autores atribuíram estes achados a menor espessura do esmalte e dentina que os incisivos inferiores apresentam em comparação com a dos pré-molares. Similar condição ocorre com a idade. Ao longo do tempo ocorre deposição contínua de dentina, aumentando a espessura da dentina e diminuindo o diâmetro dos túbulos dentinários (Murray et al, 2002), fazendo com que a permeabilidade dentinária também diminua (Mjor, 2009) reduzindo a difusão do PH para o tecido pulpar e conseqüentemente, os danos causados. Entretanto, até o presente momento não foi ainda avaliada a resposta de polpas de incisivos humanos de pacientes jovens e idosos submetidos a clareamento em consultório com gel de PH a 35%.

2 PROPOSIÇÃO

2.1 ARTIGO NÚMERO 1

“EFEITOS DA CONCENTRAÇÃO DOS AGENTES DE CLAREAMENTO EM CONSULTÓRIO SOBRE RESPOSTAS DE POLPAS HUMANAS”

Proposição geral: O propósito deste estudo clínico *in vivo* foi avaliar a resposta de polpas de incisivos inferiores humanos sadios frente ao clareamento em consultório utilizando diferentes concentrações de PH.

Proposição específica:

- Avaliar a efetividade do clareamento de incisivos inferiores humanos sadios frente ao clareamento em consultório utilizando PH a 20% e 35%.
- Avaliar a sensibilidade de incisivos inferiores humanos sadios frente ao clareamento em consultório utilizando PH a 20% e 35%.

2.2 ARTIGO NÚMERO 2

“RESPOSTA DE POLPAS HUMANAS FRENTE A DIFERENTES TÉCNICAS DE CLAREAMENTO EM CONSULTÓRIO”

Proposição geral: O propósito deste estudo clínico *in vivo* foi avaliar a resposta de polpas de incisivos inferiores humanos sadios submetidos ao clareamento em consultório com diferentes agentes clareadores e técnicas de aplicação.

Proposição específica:

- Comparar a efetividade do clareamento em consultório variando o tempo de aplicação (uma única aplicação de 45 minutos e 3 aplicações de 15 minutos cada).
- Comparar a efetividade do clareamento em consultório com a presença de cálcio na composição dos agentes clareadores.
- Avaliar a sensibilidade de incisivos inferiores humanos sadios frente ao clareamento em consultório utilizando PH a 35% e presença de cálcio na composição dos agentes clareadores.

2.3 ARTIGO NÚMERO 3

“EFEITOS DO CLAREAMENTO EM CONSULTÓRIO SOBRE TECIDO PULPAR DE INCISIVOS HUMANOS DE PACIENTES JOVENS E IDOSOS”

Proposição geral: Avaliar *in vivo* a resposta de tecido pulpar de incisivos humanos de pacientes jovens e de pacientes idosos submetidos a clareamento em consultório com PH a 35%.

Proposição específica:

- Avaliar *in vivo* a efetividade do clareamento em consultório utilizando PH a 35% em incisivos humanos de pacientes jovens e de pacientes adultos.
- Avaliar *in vivo* a sensibilidade de incisivos humanos de pacientes jovens e de pacientes idosos frente a clareamento em consultório utilizando PH a 35%.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL E MÉTODOS DOS ARTIGOS Nº1 E Nº2

3.1.1 Seleção dos dentes

O protocolo de investigação proposto para realização das presentes pesquisas foi submetido a apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa para Estudos em Seres Humanos (COEP) da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG), PR, Brasil. Após sua aprovação (Protocolo de número 09171/10 - Anexo 1), foi dado início aos trabalhos pertinentes as pesquisas.

Através de exame clínico foram selecionados pacientes de ambos os sexos, com idade máxima de 30 anos, os quais apresentavam incisivos inferiores hígidos indicados para extração por motivos ortodônticos (Figura 1). Para tal, todas as indicações de exodontia deveriam ser confirmadas por pedido oficial do profissional especialista e devidamente assinado pelo mesmo.

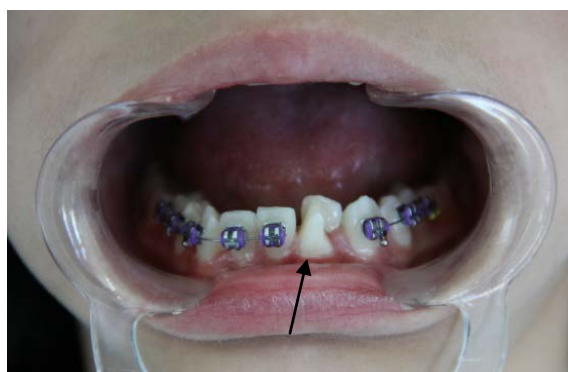


Fig 1 – Incisivo inferior hígido (31) indicado para exodontia por razões ortodônticas

3.1.2 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

Tanto os pacientes como seus respectivos representantes legais receberam os devidos esclarecimentos sobre os propósitos da pesquisa, procedimentos clínicos a serem realizados e possíveis riscos advindos deste processo. Somente após terem lido e aceito participar espontaneamente destes estudos, confirmado através da assinatura do TCLE (Anexo 2), elaborado de acordo com modelo recomendado pelo COEP em 2 vias, sendo que uma delas ficou em posse do Pesquisador e outra com o sujeito da pesquisa e obedecidos os critérios de inclusão, é que se deu início a etapa clínica das pesquisas.

3.1.3 Critérios de inclusão

Foram considerados os seguintes critérios de inclusão, além dos citados anteriormente: pacientes deveriam gozar de perfeitas condições de saúde geral e bucal, possuir os dentes incisivos inferiores livres de lesões cariosas e sem restaurações e que respondessem positivamente ao teste de sensibilidade. A cor dos incisivos inferiores deveria ser classificada como cor A2 ou maior que A2, por comparação com a escala de cores (Vita Lumin®, Vita Zahnfabrik, Bad Säckingen, Alemanha) (Figura 2). Esta escala foi organizada em ordem de luminosidade de “1” a “16”, que foi utilizada para quantificar o clareamento dental. As 16 guias da escala foram organizadas de B1 (equivalente a 1) a C4 (equivalente a 16). Embora essa escala não seja verdadeiramente linear, as alterações foram tratadas como dados lineares para efeitos de análise

estatística. A área escolhida para mensuração da cor foi o terço médio da face vestibular dos incisivos inferiores e a alteração de cor foi avaliada, estatisticamente, por meio da variação dos valores dos guias correspondentes as cores da escala Vita.



Fig 2- Escala de cores Vita Lumin®, Vita Zahnfabrik, Bad Säckingen, Alemanha. Organizada por ordem de luminosidade. Cor da escala (a) e valor numérico (b) correspondente. Foto cedida pela doutoranda Márcia Fernanda de Rezende Siqueira (Dentística, UEPG).

A avaliação de cor, utilizando o mesmo local e iluminação, foi realizada através do método subjetivo pelo pesquisador responsável (Figura 3).



Fig 3 – Avaliação inicial da cor

Os dentes a serem incluídos deveriam responder positivamente ao teste de sensibilidade ao frio (Endo-Frost®, Roeko, Alemanha) (Figura 4). O

procedimento para tal consistiu na aplicação, com auxílio de cotonete, do produto sobre a superfície vestibular dos dentes. Após 10 segundos da aplicação todos os pacientes deveriam responder positivamente. Este procedimento foi realizado 2 semanas antes do procedimento clareador.



Fig 4 - Teste de sensibilidade com Endo-Frost®, Roeko, Alemanha. Com auxílio de cotonete, aplicando sob a superfície vestibular do dente

3.1.4 Critérios de exclusão

Foram excluídos do estudo, pacientes que realizaram algum tipo de clareamento recentemente, grávidas ou que estivessem amamentando, portadores de dentes incisivos inferiores restaurados, com severas descolorações internas (manchas por tetraciclina, fluorose, dentes despulpados), apresentando trincas visíveis nas superfícies vestibulares, incisivos inferiores desvitalizados, pacientes com hábitos de bruxismo ou com qualquer patologia grave bucal ou que estivessem fazendo uso de drogas com ação anti-inflamatória ou antioxidante, se relatassem algum grau de sensibilidade espontânea no dente em estudo.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS DO ARTIGO Nº3

3.2.1 Seleção dos dentes

O protocolo de investigação proposto para realização desta pesquisa foi submetido a apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa para Estudos em Seres Humanos (COEP) da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG), PR, Brasil. Após sua aprovação (Protocolo de número 09171/10 - Anexo 1), foi dado início aos trabalhos pertinentes as pesquisas.

Baseado em critérios pré-estabelecidos, 18 participantes com incisivos inferiores hígidos programados para serem extraídos por motivos ortodônticos ou periodontais foram selecionados para este estudo. Metade dos participantes selecionados deveria ser jovem (faixa etária de 18 a 30 anos), enquanto a outra metade deveria ser de participantes idosos (com idade igual ou superior a 50 anos). Cada grupo de participantes, jovens e idosos, foi dividido em dois grupos: experimentais ([GJ],[GI]) e controle ([GCJ],[GCI]), estes não receberam nenhum tratamento.

As indicações de exodontia deveriam ser confirmadas por pedido oficial do profissional especialista e devidamente assinado pelo mesmo.

3.2.2 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

Idem ao 3.1.2, página 10.

3.2.3 Critérios de inclusão

Os participantes deveriam apresentar incisivos inferiores com cor inicial A2 ou mais escura, por comparação com a escala de cores (Vita Lumin®, Vita Zahnfabrik, Bad Säckingen, Alemanha) (Figura 2). Duas semanas antes dos procedimentos de clareamento, todos os participantes receberam informações sobre a pesquisa e após esclarecidos e terem assinado o TCLE (Anexo 3), deveriam submeter-se a profilaxia dentária.

O diagnóstico da sensibilidade da polpa foi realizado com teste a frio (Endo-Frost®, Roeko, Alemanha) (Figura 4), após 10 segundos da aplicação, os participantes deveriam responder positivamente, relatando pequena e não persistente sensibilidade. Além disso, os participantes deveriam gozar de perfeitas condições de saúde geral e bucal, incisivos inferiores sem restaurações e com necessidade de extração por motivos ortodônticos (participantes jovens) ou periodontais (participantes idosos).

3.2.4 Critérios de exclusão

Aqueles que se submeteram a procedimentos de clareamento dentário recentemente, apresentarem restaurações nestes elementos dentários, gestantes, lactantes, pacientes com descoloração interna dos dentes (manchas de tetraciclina, fluorose, dentes despulpados), com hábitos de bruxismo ou qualquer patologia grave na boca, usando droga anti-inflamatória e antioxidante de uso contínuo e apresentando algum grau de sensibilidade dentária espontânea foram excluídos.

4 DELINEAMENTO DOS ESTUDOS

Este trabalho foi dividido em 3 pesquisas e o delineamento dos estudos será detalhado separadamente como segue:

4.1 Artigo nº 1

“EFEITOS DA CONCENTRAÇÃO DOS AGENTES DE CLAREAMENTO EM CONSULTÓRIO SOBRE RESPOSTAS DE POLPAS HUMANAS”

4.1.1 Parte clínica

Os pacientes foram distribuídos em 3 grupos, de acordo com a Tabela 1.

Tabela 1 – Grupos, técnicas e amostra – art. nº1

Grupos	Técnica	amostra (n)
[G35]	Três aplicações de 15 min (PH35-3x15')	5
[G20] (*)	Três aplicações de 15 min (PH20-3x15')	4
[GC]	Sem aplicação de agente clareador	2

(*) manipulado especialmente pelo fabricante para este estudo

Todos os pacientes inicialmente foram submetidos à profilaxia bucal para remoção de manchas extrínsecas. Para isto, foi instalado o afastador de lábios Expandex (Indusbello, Ind. de instrumentos odontológicos Ltda, Londrina, PR, Brasil) e utilizado escovas Robinson (Microdont, Micro Usinagem de Precisão Ltda, São Paulo, SP, Brasil) em baixa rotação e Pasta Branco de Espanha (Asfer, Ind. Quim. Ltda, São Caetano do Sul, São Paulo, SP, Brasil) (Figura 5).



Fig. 5 – Profilaxia realizada com escova Robinson e Pasta Branco de Espanha

Ao término deste procedimento, o tecido gengival marginal vestibular dos dentes pertencentes aos grupos experimentais, foi devidamente isolado com barreira gengival fotopolimerizável (Top Dam®, FGM Produtos Odontológicos, Joinville, SC, Brasil) (Figura 6).



Fig. 6 – Barreira gengival fotopolimerizável em posição

Para os dois grupos experimentais, onde foi realizada a técnica de clareamento dental em consultório, foi utilizado o gel do clareador Whiteness HP Maxx® 35% (FGM Produtos Odontológicos, Joinville, SC, Brasil) (Figura 7) para o [G35] e uma concentração de PH a 20%, manipulado especialmente pelo fabricante para este estudo (Figura 8), para o [G20]. A composição do produto, técnica e modo de aplicação estão descritas na tabela 2.



Fig 7 - Whiteness HP Maxx® 35%, FGM Produtos Odontológicos, Joinville, SC, Brasil



Fig 8 - Peróxido de hidrogênio a 20%, manipulado especialmente pelo fabricante (FGM, Produtos Odontológicos, Joinville, SC, Brasil) para este estudo

Tabela 2 – Composição do produto, técnica e modo de aplicação – art. nº1

Composição do produto	Técnica	Modo de aplicação
PH35%: espessante, corante, glicol, carga inorgânica e água deionizada	Três aplicações de 15 min (PH35-3x15')	1. Para o clareamento de cada dente, 3 gotas da fase 1 (PH) deve ser misturada com 1 gota da fase 2 (espessante). 2. Aplicação de fina camada do gel, aproximadamente 0,5 mm de espessura, sobre a superfície vestibular do dente a ser tratado.
PH20%: espessante, corante, glicol, carga inorgânica e água deionizada (*)	Três aplicações de 15 min (PH20-3x15')	3. O gel clareador deve ser deixado na superfície dentária por 15 minutos e a seguir removido com ponta aspiradora. Este procedimento deve ser repetido por 3 vezes.

(*) Manipulado pelo fabricante especialmente para este estudo

Whiteness HP Maxx 35% e o agente clareador a base de PH a 20% (manipulado pelo fabricante especialmente para este estudo) foram manipulados segundo as recomendações do fabricante (Anexo 3). Dispensado 3 gotas da fase PH (frasco 1) e 1 gota da fase espessante (frasco 2) no casulo plástico fornecido pelo fabricante e a seguir misturado com auxílio de espátula plástica (Figura 9/a/b/c).



Fig 9 – a: 3 gotas de PH, b: 1 gota de espessante, c: mistura dos produtos do agente clareador

O gel clareador foi então aplicado com auxílio da mesma espátula plástica, recobrando totalmente a superfície exposta dos dentes a serem clareados, em uma camada de aproximadamente 0,5 mm de espessura a fim de recobrir a superfície vestibular a ser clareada (Figura 10).



Fig 10 – Momento da aplicação do gel clareador

O gel clareador foi deixado por 15 minutos sobre as superfícies dentais. Para liberar eventuais bolhas de oxigênio e favorecer o contato com os dentes, o gel foi movimentado por aproximadamente 3 vezes com auxílio de uma sonda clínica exploradora Duflex® (SSWhite artigos dentários Ltda, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) (Figura 11).



Fig 11 – Movimentação do produto com sonda exploradora

Após 15 minutos o gel foi aspirado com o auxílio de pontas plásticas aspiradoras endodônticas (WA produtos odontológicos, Bragança Paulista, SP, Brasil) e a seguir foi preparado nova porção a qual foi aplicada e assim sucessivamente até completar as 3 aplicações.

Após o tempo total de clareamento (45 minutos), os dentes foram abundantemente lavados com água (Figura 12) e, a seguir, a barreira gengival removida.



Fig 12 – Lavagem abundante e aspiração do produto

Os pacientes foram questionados se ocorreu alguma sensibilidade no dente tratado durante o período de clareamento e, antes de serem dispensados, foram orientados a observar e registrar se durante o período pós-operatório (48 horas) ocorresse alguma sensibilidade ou necessidade de uso

de analgésico. Foram instruídos a escovar seus dentes regularmente utilizando qualquer dentífrico fluoretado ofertado no comércio.

4.1.2 Parte cirúrgica

Após 2 dias do clareamento, seguindo o protocolo descrito por Costa et al. (2010); os pacientes foram submetidos a nova avaliação de cor, com o auxílio da escala Vita, conforme descrito anteriormente (Figura 13).



Fig 13 – Avaliação de cor após 2 dias do clareamento dentário

Na seqüência foram realizadas as extrações dos elementos dentários estudados, iniciando com procedimentos anestésicos, ou seja, anestesia tópica com Benzotop® (DFL, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) e anestesia infiltrativa com agulhas anestésicas curtas Septojet® (Septodont do Brasil, importadora Ltda, Barueri, São Paulo, SP, Brasil) e anestésico citocaína 3% - Cloridrato de Prilocaína 3% com Felipressina 0,03 UI/ml (Cristália, produtos químicos

farmacêuticos Ltda, Itapira, SP, Brasil) fazendo uso, aproximado, da mesma dose (1,8 ml) para todos os casos (Figura 14/a/b/c).



Fig 14– a: Anestésico tópico Benzotop®, seringa Carpule, agulha curta Septojet® e anestube de citocaína 3%; **b:** procedimento de anestesia tópica; **c:** procedimento de anestesia infiltrativa

A remoção cirúrgica proposta foi através de fórceps (Figura 15).



Fig. 15 – Exodontia com uso de fórceps

Após a remoção e realizada a sutura dos bordos cirúrgicos com fio de sutura de seda 3.0 Ethicon® (Johnson&Johnson do Brasil Ind. e comércio de produtos para saúde Ltda, São José dos Campos, SP, Brasil) (Figura 16/a/b), os dentes pertencentes aos grupos experimentais e controle tiveram suas raízes seccionadas cerca de 4-5 mm abaixo da JAC.

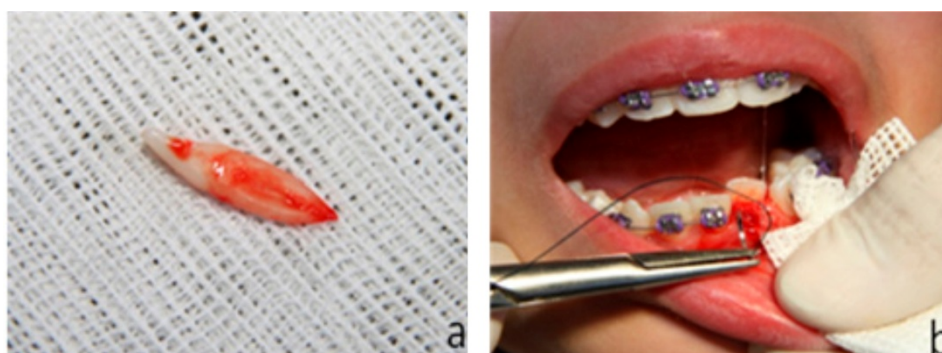


Fig 16 – a: elemento dentário extraído, b: realização de sutura

Este procedimento foi realizado em alta velocidade, utilizando-se ponta diamantada nº 2200 (KG Sorensen®, São Paulo, SP, Brasil), sob abundante refrigeração com água (Figura 17).



Fig 17 – Corte da raiz do dente com ponta diamantada nº 2200

As partes coronárias foram colocadas no interior de frascos de vidro identificados, os quais continham solução de formalina tamponada a 10% (Manipulada pelo laboratório de bioquímica do Curso de Química da UEPG, PR, Brasil com a seguinte formulação: 100 ml formaldeído p.a., 4,0 g fosfato de sódio monobásico monohidratado p.a., 6,0g fosfato de sódio dibásico anidro p.a., 900 ml água destilada) (Figura 18/a/b).

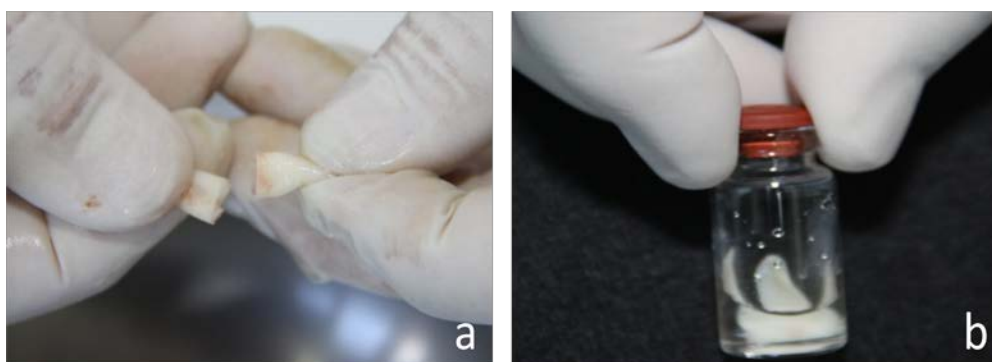


Fig 18 – a: parte coronária separada da radicular, b: parte coronária colocada em solução de formalina tamponada a 10%

Através de etiquetas autoadesivas e números em algarismos romanos, se identificou: o primeiro nome do paciente, idade, o número do elemento dentário extraído e a data da extração. O nome completo do doador, idade, o número do elemento dentário, a data do clareamento e da extração e qual técnica foram utilizados, também ficaram devidamente registrados em arquivo Excel e em posse do pesquisador responsável. Com o propósito de atender requisitos éticos em relação aos pacientes quanto a possíveis riscos de dor pós-operatória, estes foram orientados a fazer uso, se necessário, de uma medicação de suporte. Para isso foi recomendado comprimidos de

Paracetamol 750 mg (EMS, S/A, São Bernardo do Campo, SP, Brasil). A remoção da sutura ocorreu após 7 dias da data da extração. Todos os dentes foram encaminhados para o laboratório anatomopatológico do Departamento de Fisiologia e Patologia da Universidade do Estado de São Paulo (UNESP), Araraquara, São Paulo, Brasil para procedimentos de análise histopatológica dos mesmos (Anexo 4). O responsável, calibrado e experiente por esta análise, pertencente ao grupo de pesquisa coordenado pelo Prof. Dr. Carlos Alberto de Souza Costa, UNESP, Araraquara, SP, desconhecia os códigos relativos às técnicas utilizadas.

4.1.3 Parte histopatológica

O protocolo de processamento histológico e técnica de coloração seguiu a descrição de Costa et al.(2010). Os dentes foram armazenados por 48 horas em solução fixadora de formalina em pH 7.2, descalcificado em solução tamponada de Morse (50% ácido fórmico + 20% citrato sódico) por 60 dias. Após desidratados, foram incluídos em cera parafinada a vácuo e finalmente embebida em parafina, seccionados em fatias de 5-6 micrometros (μm) (“820” Spencer Microtome, Carson, CA, EUA), montados em lâminas de vidro e corados com Hematoxilina/Eosina (H/E) e Tricrômico de Masson. Dos 14 dentes submetidos a esta análise, três foram perdidos durante o processo laboratorial (2 do **[GC]** e 1 do **[G20]**), portanto, a amostra foi composta de 11 dentes (Tabela 1, pg 15). Baseado em estudos *in vivo* anteriores (Costa et al., 2007; Accorinte et al., 2008), todas as seções obtidas destes 11 dentes foram

submetidos a avaliação cega por examinador calibrado utilizando Microscópio Óptico (MO) (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha). Os eventos histopatológicos avaliados foram resposta inflamatória celular, desorganização tecidual e deposição de dentina reacional, e em cada critério os eventos histopatológicos foram classificados de “0” (tecido pulpar com características de normalidade) a “3” (tecido pulpar severamente comprometido) (Tabela 3).

Tabela 3 – Escores utilizados durante o exame histológico para cada critério avaliado (resposta inflamatória celular, desorganização tecidual e formação de dentina reacional) – art. nº1

ESCORES		RESPOSTA INFLAMATÓRIA CELULAR
		Caracterização
0	Nenhuma ou apenas algumas células inflamatórias dispersas presentes na área pulpar correspondente a superfície vestibular do dente no qual o gel clareador foi aplicado	
1	Mediana Infiltração de células inflamatórias	
2	Moderada infiltração de células inflamatórias	
3	Severa infiltração de células inflamatórias	
ESCORES		DESORGANIZAÇÃO TECIDUAL
		Caracterização
0	Tecido pulpar normal	
1	Zonas pulpares (odontoblástica, acelular e rica em células) desorganizadas na superfície vestibular do dente no qual o gel clareador foi aplicado	
2	Tecido pulpar coronário desorganizado com necrose parcial	
3	Intensa desorganização pulpar com necrose no tecido pulpar coronário e radicular	
ESCORES		FORMAÇÃO DE DENTINA REACIONAL
		Caracterização
0	Ausência	
1	Modesta deposição de tecido duro no tecido pulpar coronário	
2	Moderada deposição de tecido duro no tecido pulpar coronário	
3	Intensa deposição de tecido duro no tecido pulpar coronário e radicular	

4.1.4 Análise estatística

A mediana total da variação de unidade de cor (Δ VUC) foi calculada e comparada com o Teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney. A presença de sensibilidade dentária entre os grupos foi avaliada pelo Teste exato de Fisher. Com relação à resposta pulpar, três eventos histopatológicos foram avaliados (Tabela 3, pg. 26) de tal maneira que 3 escores por dente foram considerados para análise estatística. Todos os testes estatísticos foram realizados com nível de significância de 5% ($\alpha=0,05$) no software MedCalc (Medcalc versão 11.3.8.0, 2010, Mariakerke, Bélgica). Os significados de todos os escores (Tabela 3, pg. 26) atribuídos para os sub-itens de cada um dos 3 critérios (resposta inflamatória celular, desorganização tecidual e deposição de dentina reacional) foram tabulados e analisados estatisticamente pelo Teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis e complementado pelo Teste de Mann-Whitney com um nível de significância de 5% ($\alpha=0,05$). As múltiplas secções foram utilizadas com o objetivo de obtenção de um valor único final para cada dente.

4.2 Artigo nº 2

“RESPOSTA DE POLPAS HUMANAS FRENTE A DIFERENTES TÉCNICAS DE CLAREAMENTO EM CONSULTÓRIO”

Como já anteriormente relatado, esta investigação clínica foi aprovada pela COEP, UEPG, Ponta Grossa, Paraná, Brasil sob o número 09171/10 (Anexo 1). Os itens **3.1.1** (Seleção dos dentes), **3.1.2** (Termo de consentimento livre e esclarecido), **3.1.3** (Critérios de inclusão) e **3.1.4** (Critérios de exclusão) do capítulo **3 MATERIAL E MÉTODOS** (pg.9), foram relatados anteriormente e são iguais para os artigos de nº 1 e nº 2.

4.2.1 Parte clínica

Os pacientes foram distribuídos 4 grupos, de acordo com a Tabela 4, sendo 1 grupo controle e 3 experimentais. Os géis foram aplicados sobre a superfície vestibular dos incisivos inferiores de acordo com as instruções descritas na tabela 5.

Tabela 4 – Grupos, técnicas e amostra – art. nº 2

Grupos	Técnica	amostra (n)
(SC 3-15)	Três aplicações de 15 min (Whiteness HP Maxx35-sem cálcio)	5
(SC 1-45)	Única aplicação de 45 min (Whiteness HP Maxx35-sem cálcio)	5
(CC 1-45)	Única aplicação de 45 min (Whiteness HP Blue35-com cálcio*)	5
(GC)	Sem aplicação do agente clareador	2

*Técnica, composição e demais informações do agente clareador Whiteness HP Blue35-com cálcio (anexo 5).

Tabela 5 – Composição dos produtos, técnica (código) e modo de aplicação - art. nº2

Composição do produto		Técnica (código)	Modo de aplicação
Whiteness HP Maxx 35%	Peróxido de hidrogênio 35%, espessante, corante, glicol, carga inorgânica e água deionizada	3 aplicações de 15-min (SC 3-15)	<ol style="list-style-type: none"> 1. Para o clareamento de cada dente, 3 gotas da fase 1 (peróxido de hidrogênio) misturada a 1 gota da fase 2 (espessante). 2. Aplicação de uma fina camada do gel, aproximadamente 0,5 mm sobre a superfície vestibular do dente a ser tratado. 3. O gel clareador deve ser deixado sobre a superfície dos dentes por 15 min e após removido com auxílio de cânula aspiradora. 4. Este procedimento deve ser repetido por 3 vezes.
		Única aplicação de 45-min (SC 1-45)	<ol style="list-style-type: none"> 1. Para o clareamento de cada dente, 3 gotas da fase 1 (peróxido de hidrogênio) misturada a 1 gota da fase 2 (espessante). 2. Aplicação de uma fina camada do gel, aproximadamente 0,5 mm sobre a superfície vestibular do dente a ser tratado. 3. O gel clareador deve ser deixado sobre a superfície dos dentes por 45 min e após removido com auxílio de cânula aspiradora. 4. Este procedimento não deve ser repetido.
Whiteness HP Blue 35%	Peróxido de hidrogênio 35%, espessante, corante, glicol, carga inorgânica, cálcio e água deionizada	Única aplicação de 45-min (CC 1-45)	<ol style="list-style-type: none"> 1. Para o clareamento de cada dente, 2 seringas (peróxido de hidrogênio e espessante) são conectadas e misturadas várias vezes (Fig 19). 2. Aplicação de uma fina camada do gel, aproximadamente 0,5 mm sobre a superfície vestibular do dente a ser tratado (Fig 21). 3. O gel clareador deve ser deixado sobre a superfície dos dentes por 45 min e após removido com auxílio de cânula aspiradora. (Fig 20). 4. Este procedimento não deve ser repetido.



Fig 19 – Preparo do gel. Misturando as duas fases com as seringas conectadas, empurrando os êmbolos alternadamente por até 8 vezes, então empurre todo o conteúdo misturado para uma das seringas.



Fig 20 – Aplicação única do gel e após o tempo de 45 minutos para o HP Blue 35%, aspirando com cânula endodôntica e lavando com água abundantemente.

A parte cirúrgica e parte histopatológica acompanham os mesmos procedimentos vistos anteriormente no item **4.1.2** (pg. 21) e item **4.1.3** (pg. 25), respectivamente. Com relação a análise estatística, esta também seguiu os mesmos procedimentos do item **4.1.4** (pg. 27), inclusive utilizando os mesmos escores durante o exame histológico, como resposta inflamatória celular, desorganização tecidual e formação de dentina reacional (Tabela 3, pg. 26).

4.3 Artigo nº 3

“EFEITOS DO CLAREAMENTO EM CONSULTÓRIO SOBRE TECIDO PULPAR DE INCISIVOS HUMANOS DE PACIENTES JOVENS E IDOSOS”

4.3.1 Parte clínica

Os pacientes foram distribuídos em 4 grupos, de acordo com a idade (jovens ou idosos) e se iria ou não ser submetido ao procedimento clareador (experimental ou controle) (Tabela 6). No grupo experimental, os dentes foram clareados com gel de PH a 35% (Whiteness HP Maxx35%, FGM Produtos Odontológicos, Joinville, SC, Brasil) (Figura 7, pg.17) utilizado de acordo com instruções descritas na tabela 7 e conforme detalhado no item 4.1.1 (pg. 15) do artigo nº 1.

Tabela 6 – Grupos, técnicas e amostra – art. nº 3

Grupos	Técnica	amostra (n)
(GJ)	Três aplicações de 15 min (Whiteness HP Maxx35%)	5
(GCJ)	Sem aplicação do agente clareador	4
(GI)	Três aplicações de 15 min (Whiteness HP Maxx35%)	5
(GCI)	Sem aplicação do agente clareador	4

Tabela 7- Composição do produto, técnica e modo de aplicação – art. nº3.

Composição do produto	Modo de aplicação
PH35%, espessante, corante, glicol, carga inorgânica e água deionizada	<ol style="list-style-type: none"> 1. Para o clareamento de cada dente, 3 gotas da fase 1 (PH) deve ser misturada com 1 gota da fase 2 (espessante). 2. Aplicação de fina camada do gel, aproximadamente 0,5 mm de espessura, sobre a superfície vestibular do dente a ser tratado. 3. O gel clareador deve ser deixado na superfície dentária por 15 minutos e a seguir removido com ponta aspiradora. 4. Este procedimento deve ser repetido por 3 vezes.

A parte cirúrgica e a parte histológica acompanham os mesmos procedimentos vistos anteriormente no item **4.1.2** (pg.21) e item **4.1.3** (pg. 25), respectivamente. A única diferença será a avaliação da mensuração da espessura dentinária relatada a seguir.

4.3.2 Mensuração da espessura dentinária

Após obtidas as lâminas, estas foram analisadas utilizando-se de microscópio ótico (Diastar; Cambridge Instruments, Buffalo, NY), adaptado a uma câmara de vídeo (DXC-107A/107AP; Sony Electronics, Tóquio, Japão), 3 medidas lineares da junção esmalte/dentina a câmara pulpar foram realizadas para determinar a espessura da dentina (ED) de todas as secções de cada dente. As imagens do vídeo foram descarregadas em um computador e

processadas utilizando software Mocha (Mocha; Jondel Scientific, San Rafael, CA). A metodologia utilizada neste estudo para medir a ED foi semelhante a utilizada para determinar a espessura de dentina remanescente entre o teto da cavidade e o tecido pulpar subjacente (Costa et al, 2006; Costa et al, 2007). Foram feitas as leituras de cada dente e realizado uma média para obter-se a ED.

A parte relativa a análise estatística foi semelhante aos procedimentos descritos no item **4.1.4** (pg. 27), inclusive utilizando os mesmos escores durante o exame histológico, como resposta inflamatória celular, desorganização tecidual e formação de dentina reacional (tabela 3, pg. 26).

5 ARTIGOS

5.1 Artigo nº 1

Effect of concentration of in-office bleaching treatments on human pulp responses

Douglas A. Roderjan¹ [DDS, MS, PhD student]; Rodrigo Stanislawczuk¹ [DDS, MS, PhD student]; Diana G. S. Soares² [DDS, MS, PhD student]; Carlos A. de Souza Costa² [DDS, MS, PhD]; Alessandra Reis¹ [DDS, PhD]; Alessandro D. Loguercio¹ [DDS, MS, PhD]

¹ Department of Restorative Dentistry, School of Dentistry, State University of Ponta Grossa, Ponta Grossa/PR, Brazil.

² Department of Physiology and Pathology, School of Dentistry, Univ. Estadual Paulista, Araraquara/SP, Brazil.

Running title: Human pulp responses to in-office bleaching

Submitted to publication: *Clinical Oral Investigations* (anexo 7)

Corresponding Author:

Alessandro D. Loguercio
Universidade Estadual de Ponta Grossa – Mestrado em Odontologia
Rua Carlos Cavalcanti, 4748, Bloco M, Sala 64A, Uvaranas, Ponta Grossa, Paraná, Brazil
84030-900; e-mail: aloguercio@hotmail.com

Effect of concentration of in-office bleaching treatments on human pulp responses

Abstract

Introduction: This study evaluated the response of human pulps submitted to different concentration of hydrogen peroxide (HP) in-office bleaching techniques.

Methods: The following groups were compared: 35% HP (HP35; n=5) or 20% HP (HP20; n=4). In the control group (n=2), no tooth bleaching was performed. The color was registered at baseline and after two days using Vita Classical shade guide. Tooth sensitivity (TS) experience was also recorded during the two days post-bleaching. The bleached teeth were extracted 2 days after the clinical procedure and subjected to histological analysis. The bleaching effect (BE) and overall scores for histological evaluation was evaluated by Kruskal-Wallis and Mann-Whitney tests. The percentage of patients with TS was evaluated by Fisher's exact test ($\alpha=0.05$).

Results: The BE and TS of HP35 group were statistically different than the control ($p<0.05$) and the HP20 showed a intermediary response similar to HP35 and control ($p>0.05$). In both experimental groups, the coronary pulp tissue exhibited partial necrosis associated to reactionary dentin deposition. The subjacent pulp tissue exhibited mild inflammatory response.

Conclusion: The in-office bleaching therapies using bleaching gels with 20% or 35% HP for 45 minutes cause similar pulp damage, characterized by partial necrosis, reactionary dentin deposition and mild inflammation.

Keywords: Tooth bleaching, hydrogen peroxide, odontoblasts, materials testing, metabolism.

Introduction

The introduction of carbamide peroxide for night-guard vital bleaching (Haywood et al., 1989) has increased the popularity of bleaching procedures and in the last years, in-office bleaching therapies have become more popular (Barghi, 1998; Perdigão et al., 2004). According to a survey published in the USA among practitioners, 33% of dentists in the United States use in-office bleaching (CRA 2000). This increased search for in-office procedures is related to the fact that some patients require faster results, do not want to wear bleaching trays and are influenced by the media (Barghi, 1998; Perdigão et al., 2004).

In spite of the bleaching efficacy of in-office bleaching (Zekonis et al., 2003; Marson et al., 2008; Tay et al., 2009; Bernardon et al., 2010), tooth sensitivity is one of the most common side effect associated with this procedure. Clinical studies estimated that 55% to 100% of the patients experience bleaching-induced tooth sensitivity with a mild to severe intensity (Marson et al., 2008; Tay et al., 2009; Bernardon et al., 2010; Kossatz et al., 2011; Reis et al., 2011).

Although the etiology of this side effect has not yet been fully established, it seems that it results from the hydrogen peroxide (HP) diffusion through enamel and dentin into the pulp during tooth bleaching (Cooper et al., 1992; Hanks et al., 1993; Sulieman et al., 2004). Within 5 to 15 min after application of the bleaching gel, HP can be found in the pulp tissue, where it irritates and produces a reversible pulpitis for at-home bleaching (Anderson et al., 1999; Fugaro et al., 2004). When it comes to in-office bleaching, more severe effects are observed in lower central incisors such as pulp necrosis after applications of a 38% HP bleaching gel (Costa et al., 2010). Transenamel

and transdental damage to pulp cells, especially to the odontoblasts that underlies the dentin substrate was demonstrated in several current in vitro studies (Trindade et al., 2009; Dias Ribeiro et al., 2009).

These concerns have led some manufacturers to release low concentrated in-office bleaching gels. These products were shown to produce lower sensitivity risk in clinical studies (He et al., 2012), although their effect on pulp tissue is yet to be evaluated. Therefore, the aim of this study was to evaluate the response of pulps of mandibular anterior sound incisors submitted to in-office bleaching with different HP concentrations.

Materials and Methods

This clinical investigation was approved under protocol number 09171/10 by the Ethics Committee from the local university. Based on pre-established criteria, 11 participants with lower incisors scheduled to be extracted for orthodontic reasons were selected for this study.

All the participants had anterior teeth with initial shade A2 or darker as judged by comparison with a value-oriented shade guide (Vita Lumin, Vita Zahnfabrik, Bad Säckingen, Germany). Two weeks before the bleaching procedures, all the subjects received a dental screening and dental prophylaxis. The diagnosis of vitality pulpal was confirmed by a cold test application (Endo-Frost, Roeko, Germany). After 10 s of application, all patients should answer positively indicating a few and not lingering pain response. After reading and receiving all necessary explanations including the experimental rationale, clinical procedures and possible risks, the selected patients

signed a consent form explaining the research protocol, which was previously approved by the Ethics Committee.

Inclusion and exclusion criteria. Participants included in this clinical study had good general and oral health. The participants should have at least one caries-free mandibular incisor without restorations on the labial surfaces with shade A2 or darker and in need of extraction due to orthodontic reasons. Participants that had undergone tooth-whitening procedures, presenting anterior restorations, pregnant/lactating, with severe internal tooth discoloration (tetracycline stains, fluorosis, pulpless teeth), bruxism habits or any gross pathology in the mouth were excluded from the study. Participants using any continuous drug with anti-inflammatory and antioxidant action were also excluded. The participants were asked about the previous tooth sensitivity the week before the beginning of the bleaching therapy and those who reported any degree of spontaneous tooth sensitivity were not included in the study sample.

Study design. Participants were randomly divided into three groups according to control or the in-office bleaching therapies. After the prophylaxis procedures, the gingival tissue of the teeth to be bleached was isolated with a light-cured gingival barrier (Top Dam, FGM Dental Products, Joinville, SC, Brazil). A 35% hydrogen peroxide (HP) gel (Whiteness HP Maxx, FGM) or 20% hydrogen peroxide gel were used according to the instructions described in Table 1. All participants were instructed to brush their teeth regularly using fluoridated toothpaste (Sorriso Fresh, Colgate-Palmolive, São Paulo, Brazil).

Shade evaluation. The color was registered at baseline and two days after the bleaching session using a value-oriented shade guide (Vita Lumin, Vita Zahnfabrik). The shade guide's 16 tabs were arranged from highest (B1) to lowest (C4) value (B1*A1*B2*D2*A2*C1*C2*D4*A3*D3*B3* A3.5*B4*C3*A4*C4). Although this scale is not linear in the truest sense, we treated the changes as representing a continuous and approximately linear ranking for the purpose of analysis. The shade changes from the start of the active phase to the individual recall times were calculated by calculating the change in the number of shade guide units (Δ SGU) that occurred toward the lighter end of the value-oriented list of shade tabs. Only one calibrated and experienced evaluator recorded the shade of each subject's teeth at baseline and two days after the bleaching procedure. The measurement area of interest for shade matching was the middle third of the facial surface of teeth.

Tooth sensitivity evaluation. Two days after the procedure, the participants were asked if they had experienced any tooth sensitivity in the bleached tooth. No attempt was made to record the tooth sensitivity intensity but only if the participants experienced or not any degree of tooth sensitivity.

Histologic procedure and evaluation. This protocol followed the description of Costa et al. (2010). Two days after the bleaching procedure, the teeth were extracted under local anesthesia. The roots were immediately sectioned midway between the cement/enamel junction (CEJ) and the root tip with a high-speed handpiece under water spray. The teeth were stored for 48 h in formalin fixative solution at pH 7.2, decalcified in buffered Morse's solution, dehydrated, vacuum-infiltrated with wax

paraffin and finally embedded in paraffin. Six- μ m thick serial sections were cut ("820" Spencer Microtome, Carson, CA, USA), mounted on glass slides and stained with haematoxylin and eosin (H/E). Three teeth were lost during the laboratorial processing. Then, based upon previous in vivo studies (Costa et al., 2001; Accorinte et al., 2006), all sections obtained from 11 out 14 teeth were submitted to evaluation by a calibrated examiner blinded to the groups. Using a light microscope (62774; Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) the histopathologic events described in Table 2 were assessed and classified by a descriptive analysis.

Statistical analysis. The overall median of Δ SGU was calculated and compared with the non-parametric Kruskal-Wallis test and Mann-Whitney U-test. The absolute risk of tooth sensitivity among groups was evaluated by Fisher's exact test. Regarding the pulp response, three established histopathological events were evaluated (Table 2) in such way that 3 scores per tooth were considered for statistical analysis. The overall comparison of the groups was performed with the non-parametric Kruskal-Wallis statistical analysis. The comparisons between groups were performed using the Mann-Whitney U-test. All tests were performed with appropriately computed critical values ($\alpha = 0.05$) in the MedCalc software (MedCalc Version 11.3.8.0, 2010, Mariakerke, Belgium).

Results

The age of the participants arranged for this study varied between 12 and 30 years old (mean 16.9 ± 5.7). The means and standard deviations of color measurement

are shown in Table 3. The Δ SGU of all bleaching concentrations were statistically similar ($p > 0.49$). However, only technique that used 35% HP (HP35) were different from the non-bleached control group ($p = 0.03$).

A statistically higher absolute risk of tooth sensitivity was observed for the groups bleached with 35% HP ($p = 0.007$; Table 3). The groups bleaching with 20% HP (HP20) was not statistically different from the others ($p > 0.28$).

The scores for every criterion determined by the histological assessment of the specimens according to groups are shown in Table 4. Overall, the histological features showed that the pulp tissue observed in control group was quite different in comparison to the experimental groups in which the teeth were bleached ($p = 0.003$). Teeth from the control group showed pulp tissue with normal histological characteristics, lack of inflammatory response and no tissue disorganization (Figure 1).

However, a notable difference in the pulp responses occurred in the bleached groups (Figure 2), regardless of HP concentration. Four and three human incisors bleached with gels containing 35% (HP35) or 20% (HP20) hydrogen peroxide, respectively, showed a wide zone of coagulation necrosis in the coronary pulp tissue associated to deposition of reactionary dentin (Figure 2a, 2b, 2e and 2f). In one of those five teeth bleached with HP35, the reactionary dentin observed adjacent to the necrotic tissue was continuous to that deposited in the lateral walls of the root pulp tissue (Figure 2a, 2c). In eight of those nine bleached teeth, a mild inflammatory response mediated by mononuclear cells among dilated and congested blood vessels was observed (Figure 2c, 2d, 2g and 2h).

Discussion

Although the main goal of this study was to measure the pulpal response to different HP concentrations, the efficacy and tooth sensitivity was also evaluated in an attempt to verify if the bleaching agent was effective in producing a whitening effect and the likely side effects of the protocols evaluated.

So far no clinical study has compared in a single study design, the bleaching efficacy and tooth sensitivity of gels containing 20% or 35% of hydrogen peroxide (HP) in their composition. Usually, studies that employed lower HP concentrations for in-office bleaching reports lower degree of whitening and tooth sensitivity (Kugel et al., 2009; Ontiveros, Pavarina, 2009) when compared to studies that evaluated 35% HP concentration (Marson et al., 2008; Tay et al., 2009; Bernardon et al., 2010; Kossatz et al., 2011; Reis et al., 2011).

Although the present study design was not planned specifically to compare the bleaching efficacy and tooth sensitivity of gels with different HP concentrations, It was possible to observe lower degree of tooth bleaching and less tooth sensitivity for the 20% HP gel. This was somewhat expected since the concentration of HP in a bleaching gel has a marked effect on the number of applications required to produce an optimal shade outcome (Sulieman et al, 2004), meaning that bleaching gels with a lower HP concentration requires more applications to produce similar tooth bleaching effect (Sulieman et al, 2004). On the other hand, the differences in clinical symptoms and signs between HP concentrations were not observed when the histopathology features of the pulps bleached with 20 or 35% HP were compared one another. This likely indicates that the amount of HP that reaches the pulp after application of a 20% HP gel

is already enough to produce similar damage to the pulp tissue than the 35% HP. The application of 35% HP in-office bleaching gel was shown to result in trans-enamel and trans-dentinal cytotoxic effects characterized by direct damage to cultured odontoblast-like cells and a decrease of their metabolic activity (Dias Ribeiro et al., 2009; Trindade et al., 2009).

It has been demonstrated HP and the products of its degradation, such as hydroxyl (OH-) ions may act as free radicals to cause oxidative stress in the pulp cells (Kawamoto, Tsujimoto, 2004). The increase of reactive oxygen specimen levels cause deleterious effects to several cell components, like mutagenesis, carcinogenesis, cell membrane damage by peroxidation lipid, and protein fragmentation (Sies, 1993; Martindale, Holbrook 2002), which may reduce cell proliferation and result in cell necrosis or apoptosis (Allen, Tresini 2000; Trindade et al., 2009; Ribeiro et al., 2009).

Although cytotoxic effects to cultured cells were also shown to occur after use of lower HP concentrations (Hanks et al., 1993), this does not explain the lack of agreement between the clinical symptoms of the participants in this study and the pulp response to the gels with different HP concentrations, since the amount of HP that reaches the pulp tissue is directly proportional to the HP concentration and the contact time of the product on the enamel (Cooper et al., 1992; Hanks et al., 1993; Sulieman et al., 2004). Earlier studies that attempted to correlate clinical symptomatology and pulp response after different operative procedures have not succeed in finding positive correlation (Costa et al., 2001; Accorinte et al., 2006).

Perhaps the expression of inflammatory mediators such as substance-P (a nerve-released vasoactive peptide) (Caviedes-Bucheli et al., 2008) and arachidonic acid

metabolites, such as prostaglandins (PGs), which have a recognized role in triggering and subsequently potentiate nociceptive impulses that are transmitted to the central nervous system for the perception of pain (Huynh, Yagiela, 2003) may be proportional to the amount of HP that reaches the pulp. However this issue still deserves further evaluations.

It is worth mentioning that the pulp response of bleached teeth in the present investigation as well as in the Costa et al. (2010) study is not in agreement with previous literature findings. Earlier in vivo studies demonstrated insignificant pulp damage after in-office bleaching. For instance Cohen, Chase (1979) applied 35% HP associated to heat during three 30-min applications and showed no histological evidence to pulpal damage. Another study reported only mild inflammation after two applications of 5-min of a 35% HP product (Robertson, Melfi, 1980). More recently, Kina et al. (2011) also showed no pulpal damage after the use of 38% HP gel 3 times, 10-min application each, with or without light-activation. The main difference between the previous studies and the present one is the type of tooth submitted to bleaching procedures. In the present study, mandibular incisors, instead of premolars used in the aforementioned studies (Cohen, Chase, 1979; Robertson, Melfi, 1980; Kina et al., 2011), had their pulp tissue evaluated after in-office bleaching therapies.

In fact, in a review of literature, Haywood (2005) reported that bleaching-induced tooth sensitivity usually affects the smaller teeth, such as the maxillary laterals and the mandibular incisors. This was also proved by Costa et al. (2010) who evaluated the histological pulp response of incisors and premolars submitted to in-office bleaching therapy. The authors showed necrosis in the coronary pulp tissue of lower

incisors but not in premolars when a bleaching gel with high concentration hydrogen peroxide (38%) was evaluated (Costa et al., 2010). It was suggested that the thinner layer of enamel and dentin in the mandibular incisors compared to premolars may reduce the fast diffusion of HP across the tooth hard tissues to reach the pulp. Therefore, odontoblasts and endothelial cells may get more time to produce peroxidases, catalases (Bowles, Burns, 1992) and oxygenases (Anderson et al., 1999) to protect the pulp against the damage caused by HP.

From a clinical standpoint, the results of this study should be interpreted with caution. Whether or not the pulp damage caused by HP is reversible is yet to be addressed. Besides that, to the extent of the author's knowledge, no clinical study has reported pulp death after in-office bleaching and thus further studies evaluating pulp vitality at long-term after in-office bleaching should be conducted as well as other bleaching therapies that deliver lower amount of HP on the enamel surface (Matis et al. 2009; Reis et al., 2011).

One limitation of this in vivo study is that the participants were young. It is known that young patients sound teeth present dentinal tubules with wide inner diameter and the dentin substrate is thin since none or a small layer of secondary dentin is present. Therefore, it is expected that higher amount of HP or other reactive oxygen species (EROS) may diffuse faster through enamel and dentin to cause damage to the pulp tissue. In this way, further in vivo studies are needed to evaluate if similar pulpal damage, as demonstrated in the present investigation, also take place in teeth of older patients submitted to in-office bleaching therapies.

According to the methodology employed in the present in vivo study and based upon the data obtained, it may be concluded that bleaching gels with 20% or 35% HP applied for 45 minutes on the buccal enamel surface of lower human incisors cause similar pulpal damage, characterized by partial necrosis of coronary pulp tissue associated with reactionary dentin deposition and mild inflammatory response.

Acknowledgements

This study was performed by Douglas Augusto Roderjan as partial fulfillment of his PhD's degree at the University Estadual de Ponta Grossa (UEPG), Ponta Grossa, PR, Brazil. The authors would like to thank FGM Dental Products for the generous donation of all products used in this study. This study was partially supported by National Council for Scientific and Technological Development under grants 301937/2009-5; 301891/2010-9; and 301291/2010-1.

References

1. Haywood VB, Heymann HO. Nightguard vital bleaching. *Quintessence Int* 1989;20:173-6.
2. Barghi N. Making a clinical decision for vital tooth bleaching: At-home or in-office? *Compen Contin Educ Dent* 1998;19:831-8.
3. Perdigão J, Baratieri LN, Arcari GM. Contemporary trends and techniques in tooth whitening: A review. *Pract Proced Aesthet Dent* 2004;16:185-92.
4. Clinical Research Associates. Vital tooth bleaching, in-office. *CRA Newsletter* 2000;24:1-3.
5. Zekonis R, Matis BA, Cochran MA, Al Shetri SE, Eckert GJ, Carlson TJ. Clinical evaluation of in-office and at-home bleaching treatments. *Oper Dent*. 2003; 28(2):114-21
6. Marson FC, Sensi LG, Vieira LC, Araújo E. Clinical evaluation of in-office dental bleaching treatments with and without the use of light-activation sources. *Oper Dent* 2008;33:15-22.

7. Tay LY, Kose C, Loguercio AD, Reis A. Assessing the effect of a desensitizing agent used before in-office tooth bleaching. *J Am Dent Assoc* 2009;140:1245-51.
8. Bernardon JK, Sartori N, Ballarin A, Perdigão J, Lopes GC, Baratieri LN. Clinical performance of vital bleaching techniques. *Oper Dent* 2010;35:3-10.
9. Kossatz S, Dalanhol AP, Cunha T, Loguercio A, Reis A. Effect of light activation on tooth sensitivity after in-office bleaching. *Oper Dent* 2011;36:251-7.
10. Reis A, Tay LY, Herrera DR, Kossatz S, Loguercio AD. Clinical effects of prolonged application time of an in-office bleaching gel. *Oper Dent* 2011;36:590-6.
11. Cooper JS, Bokmeyer TJ, Bowles WH. Penetration of the pulp chamber by carbamide peroxide bleaching agents. *J Endod*. 1992; 18(7):315-7.
12. 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;72:931-8.
13. Sulieman M, Addy M, MacDonald E, Rees JS. The effect of hydrogen peroxide concentration on the outcome of tooth whitening: an in vitro study. *J Dent* 2004;32:295-9.
14. Anderson DG, Chiego DJ Jr, Glickman GN, McCauley LK. A clinical assessment of the effects of 10% carbamide peroxide gel on human pulp tissue. *J Endod* 1999;25:247-50.
15. Fugaro JO, Nordahl I, Fugaro OJ, Matis BA, Mjör IA. Pulp reaction to vital bleaching. *Oper Dent* 2004;29:363-8.
16. Costa CAS, 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:e59-64.
17. Trindade FZ, Ribeiro AP, Sacono NT, Oliveira CF, Lessa FC, Hebling J, Costa CAS. Trans-enamel and trans-dentinal cytotoxic effects of a 35% H₂O₂ bleaching gel on cultured odontoblast cell lines after consecutive applications. *Int Endod J* 2009;42:516-24.
18. Dias Ribeiro AP, Sacono NT, Lessa FC, Nogueira I, Coldebella CR, Hebling J, de Souza Costa CAS. 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;108:458-64.
19. He LB, Shao MY, Tan K, Xu X, Li JY. The effects of light on bleaching and tooth sensitivity during in-office vital bleaching: A systematic review and meta-analysis. *J Dent* 2012;Apr20.[Epub ahead of print].
20. Costa CAS, Nascimento ABL, Teixeira HM, Fontana UF. Response of human pulps capped with a self-etching adhesive system. *Dent Mater* 2001;17:230-40.
21. Accorinte MLR, Reis A, Dourado Loguercio A, Cavalcanti de Araújo V, Muench A. Influence of rubber dam isolation on human pulp responses after capping with calcium hydroxide and an adhesive system. *Quintessence Int* 2006;37:205-12.
22. Kugel G, Ferreira S, Sharma S, Barker ML, Gerlach RW. Clinical trial assessing light enhancement of in-office tooth whitening. *J Esthet Restor Dent* 2009;21:336-47.
23. Ontiveros JC, Paravina RD. Color change of vital teeth exposed to bleaching performed with and without supplementary light. *J Dent* 2009;37:840-7.
24. Kawamoto K, Tsujimoto Y. Effects of the hydroxyl radical and hydrogen peroxide on tooth bleaching. *J Endod* 2004;30:45-50.
25. Sies H. Strategies of antioxidant defense. *Eur J Biochem* 1993;215:213-9.
26. Martindale JL, Holbrook NJ. Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival. *J Cell Physiol* 2002;192:1-15.
27. Allen RG, Tresini M. Oxidative stress and gene regulation. *Free Radic Biol Med* 2000;28:463-99.

28. Caviedes-Bucheli J, Ariza-Garcia G, Restrepo-Mendez S, et al. The effect of tooth bleaching on substance P expression in human dental pulp. *J Endod* 2008;34:1462-5.
29. Huynh MP, Yagiela JA. Current concepts in acute pain management. *J Calif Dent Assoc* 2003;31:419-27.
30. Cohen SC, Chase C. Human pulpal response to bleaching procedures on vital teeth. *J Endod* 1979;5:134-8.
31. Robertson WD, Melfi RC. Pulpal response to vital bleaching procedures *J Endod* 1980;6:645-49.
32. Kina JF, Huck C, Riehl H, Martinez TC, Sacono NT, Ribeiro AP, Costa CAS. Response of human pulps after professionally applied vital tooth bleaching. *Int Endod J* 2010;43:572-80.
33. Haywood VB. Treating sensitivity during tooth whitening. *Compend Contin Educ Dent* 2005; 26:11-20.
34. Bowles WH, Burns H Jr. Catalase/peroxidase activity in dental pulp. *J Endod* 1992;18:527-34.
35. Matis BA, Cochran MA, Wang G, Eckert GJ. A clinical evaluation of two in-office bleaching regimens with and without tray bleaching. *Oper Dent* 2009;34:142-9.

Table 1 – Product composition, technique (code) and application regimes.

Product composition	Technique (code)	Application regimes
35% hydrogen peroxide, thickeners, dye mixture, glycol, inorganic load and deionized water	Three 15-min applications (HP35)	<ol style="list-style-type: none"> 1. For the bleaching of each tooth, three drops of phase 1 (hydrogen peroxide) should be mixed with one drop of phase 2 (thickener). 2. Application of a thin layer of gel, approximately 0.5 mm thick, on the buccal surface of all teeth undergoing treatment. 3. The bleaching gel should be left on the teeth surface for 15 min and then removed with an aspirator. 4. This procedure should be repeated 3 times.
20% hydrogen peroxide, thickeners, dye mixture, glycol, inorganic load and deionized water (*)	Three 15-min applications (HP20)	<ol style="list-style-type: none"> 1. For the bleaching of each tooth, three drops of phase 1 (hydrogen peroxide) should be mixed with one drop of phase 2 (thickener). 2. Application of a thin layer of gel, approximately 0.5 mm thick, on the buccal surface of all teeth undergoing treatment. 3. The bleaching gel should be left on the teeth surface for 15 min and then removed with an aspirator. 4. This procedure should be repeated 3 times.

(*) Manipulated by the manufacturer specially for this study

Table 2 - Scores used during the histological examination: inflammatory cell response, tissue disorganization and reactionary dentin formation.

Score	INFLAMMATORY CELL RESPONSE
	Characterization
0	None or a few scattered inflammatory cells present in the pulp area corresponding to the buccal surface of the tooth in which the bleaching gel was applied
1	Mild inflammatory cell infiltrate with polymorphonuclear or mononuclear leukocytes
2	Moderate inflammatory cell infiltrate
3	Severe inflammatory cell infiltrate
Score	TISSUE DISORGANIZATION
	Characterization
0	Normal pulp tissue
1	Pulp zones (odontoblast, acellular, and cell-rich) disorganization in the buccal surface of the tooth in which the bleaching gel was applied
2	Coronary pulp tissue disorganization with partial local necrosis
3	Intense pulp disorganization with necrosis in the coronay and root pulp tissue
Score	REACTIONARY DENTIN FORMATION
	Characterization
0	Absence
1	Modest hard tissue deposition in coronary pulp of the tooth in which the bleaching gel was applied
2	Moderate hard tissue deposition in the coronay pulp tissue of the tooth in which the bleaching gel was applied
3	Intense hard tissue deposition in the coronay and root pulp tissue

Table 3 – Means \pm standard deviations and medians of shade guide units and Δ SGU for the experimental groups as well as the number of patients with tooth sensitivity for each group.

Groups	Shade guide unit				Δ SGU (*)	Sensitivity	
	Before		After				
	Mean \pm SD	Median (1 st /3 rd interquartile ranges)	Mean \pm SD	Median (1 st /3 rd interquartile ranges)			
Control	6.0 \pm 3.0	5 (5/9)	6.0 \pm 3.0	5 (5/9)	0.0 \pm 0.0	0 (5/9) A	2/0 a
HP35	5.8 \pm 1.8	5 (5/5)	3.2 \pm 1.6	2 (2/5)	2.6 \pm 1.5	3 (3/3)B	5/5 b
HP20	5.0 \pm 0.0	5 (5/5)	3.8 \pm 1.6	5 (2/5)	1.2 \pm 1.6	1.5 (0/3) A,B	4/2 a,b

(*) Similar upper case letters indicate statistically similar groups for Δ SGU (Mann-Whitney test, $p < 0.05$). (**) Similar lower case letters indicate statistically similar groups for tooth sensitivity (Fisher exact, test $p < 0.05$).

Table 4 - Number of specimens for each group in each criterion as well as multiple comparisons among the experimental conditions.

Groups	Criteria															Overall Median (*)
	Inflammatory cell response					Tissue disorganization					Reactionary dentin formation					
	0	1	2	3	Median	0	1	2	3	Median	0	1	2	3	Median	
Control	2	0	0	0	0	2	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0 B
HP35	0	5	0	0	1	0	1	4	0	2	0	0	4	1	2	2 A
HP20	0	3	1	0	1	0	1	3	0	2	0	0	4	0	2	2 A

(*) Overall medians for each group. Different letters mean significant differences ($p < 0.05$)

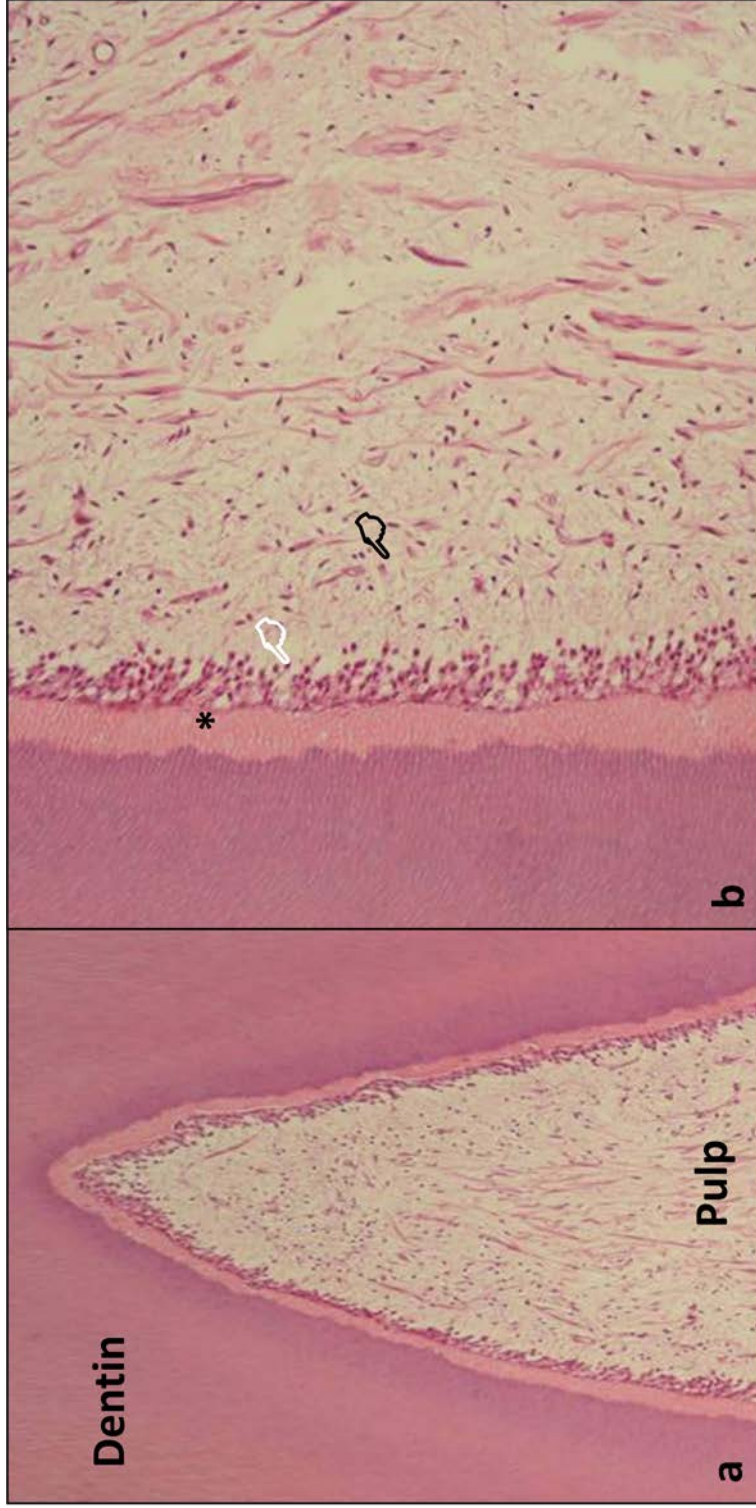


Figure 1 (control group) - Dentin-Pulp complex of inferior incisor without treatment. a: general view of the coronal pulp tissue that exhibits normal histological features. b: (high magnification of figure 1a). The pulp tissue exhibits all defined histological zones. Note a continuous odontoblast layer (white hand) underlying the pre-dentin layer (asterisk). The no inflamed subjacent pulp tissue shows pulp cells dispersed among a number of small blood vessels (black hand)(H.E., 32 and 125x).

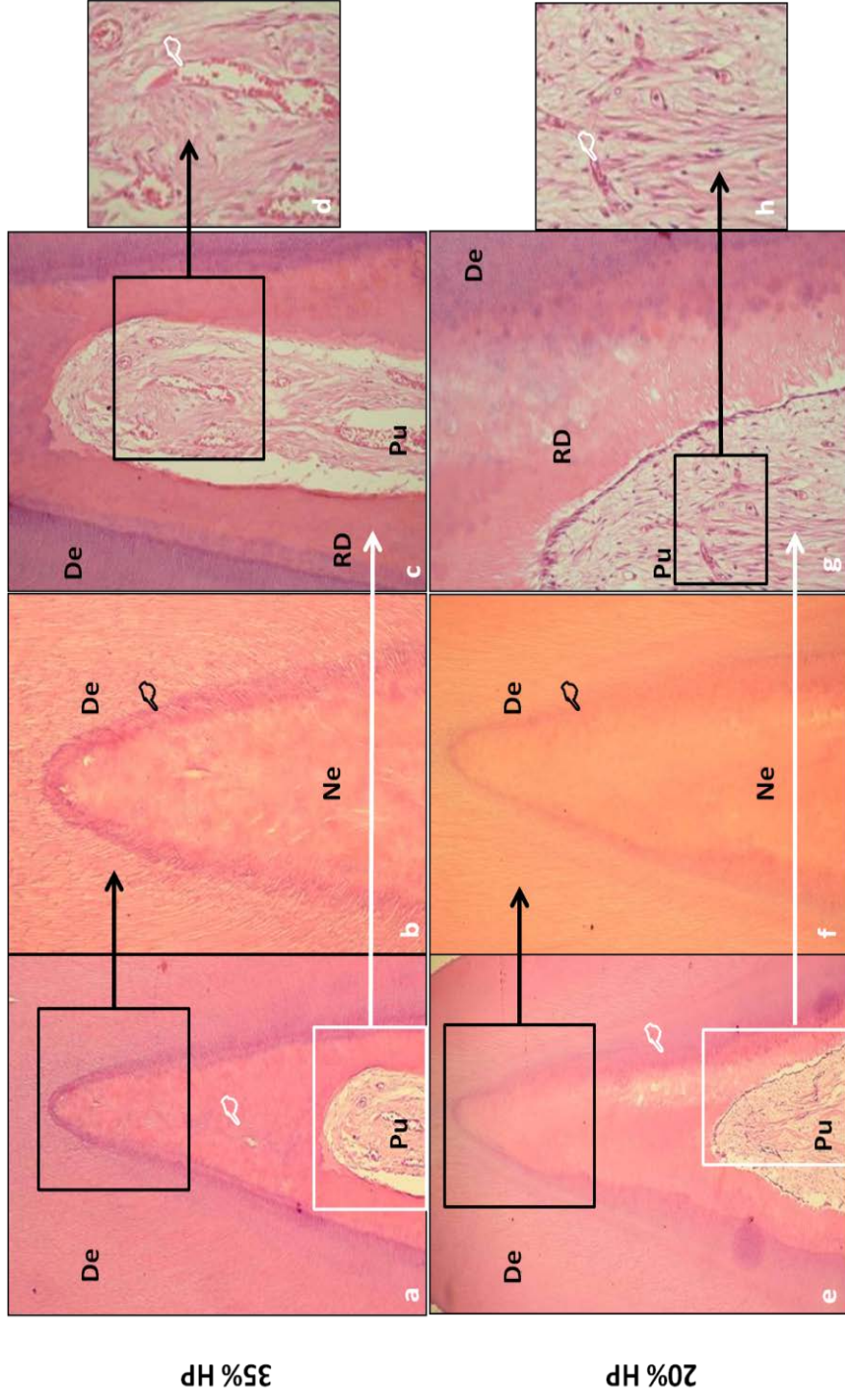


Figure 2 – Pulp-dentin complex of inferior incisors submitted to the in-office bleaching treatment (“a-d” = HP35 and “e-h” = HP20). a: The coronal pulp tissue exhibits a wide area of necrosis (white hands) associated to notable deposition of reactionary dentin. (H/E, 40x). b: High magnification of figure 2a. Note the transition border (black hands) between the tubular dentin (De) and the necrotic pulp tissue (Ne) (84x). c: The coronary and root pulp tissue exhibits continuous deposition of reactionary dentin (RD) (H/E, 125x). d: Detail of the pulp area demonstrated in figure 2c. The residual pulp tissue shows only a few inflammatory mononuclear cells among dilated and congested blood vessels (white hand) (H/E, 250x). e: Reactionary dentin (white hand) adjacent to the partial coronary pulp necrosis. Note the residual pulp (Pu) tissue (H/E, 40x). f: High magnification of the tip of pulp horn with necrotic tissue (Ne). Note the transition zone (black hand) between the tubular dentin (De) and the necrotic tissue (H/E, 84x). g: Detail of figure 2e. Subjacent to the tubular dentin (De) a wide layer of reactionary dentin (RD) is observed, Note the residual coronary pulp tissue (Pu) (H/E, 125x. h: Detail of figure 2g. Only a few mononuclear inflammatory cells among blood vessels can be seen (H/E, 250x).

5.2 Artigo nº 2

Response of human pulps to different in-office bleaching techniques

Douglas A. Roderjan¹ [DDS, MS, PhD student]; Rodrigo Stanislawczuk¹ [DDS, MS, PhD student]; Josimeri Hebling² [DDS, MS, PhD]; Carlos A. de Souza Costa³ [DDS, MS, PhD]; Alessandra Reis¹ [DDS, PhD]; Alessandro D. Loguercio¹ [DDS, MS, PhD]

¹ Department of Restorative Dentistry, School of Dentistry, State University of Ponta Grossa, Ponta Grossa/PR, Brazil.

² Department of Orthodontics and Pediatric Dentistry, University Estadual Paulista, Araraquara/SP, Brazil.

³ Department of Physiology and Pathology, School of Dentistry, University Estadual Paulista, Araraquara/SP, Brazil.

Running title: Human pulp responses to in-office bleaching

Submitted to publication: *Journal of Oral Pathology and Medicine* (Anexo 8)

Corresponding Author:

Alessandro D. Loguercio
Universidade Estadual de Ponta Grossa – Pós Graduação em Odontologia
Rua Carlos Cavalcanti, 4748, Bloco M, Sala 64A, Uvaranas, Ponta Grossa, Paraná, Brazil
84030-900; e-mail: aloguercio@hotmail.com

Response of human pulps to different in-office bleaching techniques

Abstract

Objective: This study evaluated the pulp response of human teeth subjected to different in-office bleaching techniques and materials. **Material and methods:** A calcium-free (Whiteness HP Maxx [CF], FGM) and a calcium-containing (Whiteness HP Blue 35% [CC], FGM) 35% hydrogen peroxide (HP) gels were evaluated. The CF product was employed in three 15-min applications (CF 3-15) or in a single 45-min application (CF 1-45). The product HPB was used only in a single 45-min application (CC 1-45). Each technique was applied in 5 lower incisors scheduled for extraction. In control group, no tooth bleaching was performed. The tooth color was registered at baseline and two days after the bleaching procedures using Vita Classical shade guide. Tooth sensitivity (TS) experience was also recorded during the two days post-bleaching. The bleached teeth were extracted 2 days after the clinical procedures and subjected to histological analysis. The clinical bleaching effect (BE) and overall scores for histological evaluation was evaluated by Kruskal-Wallis and Mann-Whitney tests. The percentage of patients with TS was evaluated by Fisher's exact test ($\alpha=0.05$).

Results: The BE observed for all bleaching therapies evaluated were similar and statistically different from the control ($p<0.05$). However, TS of groups bleached with CF was statistically higher than that recorded for CC and the control ($p<0.05$). In CF 3-15 and CF 1-45 groups, the coronary pulp tissue exhibited partial necrosis associated to tertiary dentin deposition. In CC 1-45 group smaller area of necrosis occurred only in three bleached teeth in which tertiary dentin deposition was observed. **Conclusion:** According to the methodology used in this in vivo study, it can be concluded that the

in-office bleaching therapy using a calcium-containing 35%HP gel causes lower pulp damage and less tooth sensitivity than a calcium-free 35%HP gel.

Keywords: Tooth bleaching, hydrogen peroxide, odontoblasts, materials testing, metabolism.

Introduction

Although clinical studies have shown that in-office bleaching can reach as satisfactory degree of whitening as the at-home bleaching as long as the materials are used for appropriate time (Zekonis et al., 2003; Auschill et al., 2005; da Silva Gottardi et al., 2006; Bernardon et al., 2010; Costa et al., 2010) in-office tooth bleaching shows a high risk of tooth sensitivity (TS). Approximately 55 to 100% of the patients experience bleaching-induced TS with a mild to severe intensity (Marson et al., 2008a; Tay et al., 2009; Bernardon et al., 2010; Kossatz et al., 2011; Reis et al., 2011).

The literature believes that the damage caused by hydrogen peroxide (HP) diffusion into the pulp during tooth bleaching (Cooper et al., 1992; Hanks et al., 1993; Benetti et al., 2004; Sulieman et al., 2004; Gökay et al., 2005) is responsible for the TS (Markovitz et al., 2010). Within 5 to 15 min after application of bleaching gels, HP can be found in the pulp tissue, where it irritates nerves and produces a reversible pulpitis for at-home bleaching gels (Anderson et al., 1999; Fugaro et al., 2004). However, it seems that more severe effects, such as pulp necrosis takes place in pulps of lower central incisors after application of a 38% HP in-office bleaching gel (Costa et al., 2010). In addition, several current in vitro studies have demonstrated the occurrence of transenamel and transdentinal damage to cultured pulp cells after in-office HP application on enamel (Trindade et al., 2009; Dias Ribeiro et al., 2009; Coldebella et al., 2009).

Although the concentration of HP in in-office bleaching gels is similar among different brands, products differ one another as other components and additives are included in their formulation. For instance, there are products formulated with

desensitizing agents (Matis et al., 2007; Browning et al., 2008; Gallo et al., 2009), amorphous calcium phosphate (Giniger et al., 2003) or calcium gluconate (Kossatz et al., 2012). Besides that, the pH of these products varies substantially among product brands (Price et al., 2000; Freire et al., 2009). Non study has so far addressed the effects of these variations on the pulp response of human teeth.

Variations in the product application may also have an impact on TS. In-office bleaching gels are usually applied on tooth surfaces, left undisturbed for a while (usually 15 min) and then the product is refreshed 3 to 4 times in each clinical appointment, depending on the bleaching gel brand. In an attempt to reduce chair-time and the costs associated with in-office bleaching gels, some studies evaluated the bleaching effectiveness and TS of a single 45-min application (Matis et al., 2009; Reis et al., 2011). Since the diffusion of HP through dentin depends on the original concentration of this chemical component in the bleaching gel, the number of product applications and the length of time the gel is maintained in contact with the dentin (Cooper et al., 1992; Hanks et al., 1993; Benetti et al., 2004; Sulieman et al., 2004) this single-product application might reduce the amount of HP that reaches the pulp chamber and may also cause less damage to pulp cells than three 15-min applications. However, to the extent of the author's knowledge the effect of this technique on pulp tissue has not been addressed yet. Therefore, the aim of this study was to evaluate the response of human pulps of mandibular anterior sound incisors subjected to in-office bleaching with different products and techniques.

Materials and Methods

This clinical investigation was approved under protocol number 09171/10 by the Ethics Committee from the local University. Based on pre-established criteria, 17 participants with lower incisors scheduled to be extracted for orthodontic reasons were selected for this study.

All the participants had anterior teeth with initial shade A2 or darker as judged by comparison with a value-oriented shade guide (Vita Lumin, Vita Zahnfabrik, Bad Säckingen, Germany). Two weeks before the bleaching procedures, all the subjects received a dental screening and tooth prophylaxis. The diagnosis of pulp sensitivity was evaluated by a cold test application (Roeko-Endo-Frost, Coltène/Whaledent, Langenau, Germany). After 10 s of application, all patients should answer positively to this test indicating a few and not lingering pain response. After reading and receiving all necessary explanations including the experimental rationale, clinical procedures and possible risks, the selected patients signed a consent form explaining the research protocol, which was previously approved by the Ethics Committee.

Inclusion and exclusion criteria. Participants included in this clinical study had good general and oral health. The participants should present at least one caries-free mandibular incisor without restorations on the labial surface with shade A2 or darker in need of extraction due to orthodontic reasons. Participants that had undergone tooth-whitening procedures, presenting anterior restorations, pregnant/lactating, with severe internal tooth discoloration (tetracycline stains, fluorosis, pulpless teeth), bruxism habits or any gross pathology in the mouth were excluded from the study.

Participants using any continuous drug with anti-inflammatory and antioxidant action were also excluded. The participants were asked about the previous TS the week before the beginning of the bleaching therapy and those who reported any degree of spontaneous TS were not included in the study sample.

Study design. Participants were randomly divided into four groups according to control or the in-office bleaching therapies. After the prophylaxis procedures, the gingival tissue of the teeth to be bleached was isolated with a light-cured gingival barrier (Top Dam, FGM Dental Products, Joinville, SC, Brazil). A calcium-free and a calcium containing (Whiteness HP Maxx [CF], Whiteness HP Blue 35 [CC], FGM) 35% HP gels were applied on the buccal surface of the incisors according to the instructions described in Table 1. All participants were instructed to brush their teeth regularly using a fluoridated toothpaste (Sorriso Fresh, Colgate-Palmolive, São Paulo, Brazil).

Shade evaluation. The color was registered at baseline and two days after the bleaching session using a value-oriented shade guide (Vita Lumin, Vita Zahnfabrik). The shade guide's 16 tabs were arranged from highest (B1) to lowest (C4) value (B1*A1*B2*D2*A2*C1*C2*D4*A3*D3*B3* A3.5*B4*C3*A4*C4). Although this scale is not linear in the truest sense, we treated the changes as representing a continuous and approximately linear ranking for the purpose of analysis. The shade changes from the start of the active phase to the individual recall times were calculated by calculating the change in the number of shade guide units (Δ SGU) that occurred toward the lighter end of the value-oriented list of shade tabs. Only one calibrated and experienced evaluator recorded the shade of each subject's teeth at baseline and two

days after the bleaching procedure. The measurement area of interest for shade matching was the middle third of the facial surface of teeth.

Tooth sensitivity evaluation. Two days after the procedure, the participants were asked if they had experienced any TS in the bleached tooth. No attempt was made to record the TS intensity but only if the participants experienced or not any degree of TS.

Clinical/Laboratorial procedures and Histological evaluation. This protocol followed a modified description of Costa et al. (2010). Two days after the bleaching procedure, the teeth were extracted under local anesthesia. The roots were immediately sectioned midway between the cement/enamel junction (CEJ) and the root tip with a high-speed handpiece under water spray. The teeth were stored for 48 h in formalin fixative solution at pH 7.2, decalcified in buffered Morse's solution, dehydrated, vacuum-infiltrated with wax paraffin and finally embedded in paraffin. Six- μ m thick serial sections were cut ("820" Spencer Microtome, Carson, CA, USA), mounted on glass slides and stained with hematoxylin and eosin (H/E) and Masson Trichrome. Then, based upon previous in vivo studies (Costa et al., 2007; Accorinte et al., 2008), all sections obtained from those 17 teeth were submitted to evaluation by a calibrated examiner blinded to the groups. Using a light microscope (62774; Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) the histopathologic events described in Table 2 were assessed and classified by a descriptive analysis.

Statistical analysis. The overall median of Δ SGU was calculated and compared with the non-parametric Kruskal-Wallis test and Mann-Whitney U-test. The absolute

risk of TS among groups was evaluated by Fisher's exact test. Regarding the pulp response, three established histopathological events were evaluated (Table 2) in such way that 3 scores per tooth were considered for statistical analysis. The overall comparison of the groups was performed with the non-parametric Kruskal–Wallis statistical analysis. The comparisons between groups were performed using the Mann-Whitney U-test. All tests were performed with appropriately computed critical values ($\alpha = 0.05$) in the MedCalc software (MedCalc Version 11.3.8.0, 2010, Mariakerke, Belgium).

Results

The age of the participants included in this study varied between 12 and 26 years old (mean 18.2 ± 4.9). The means and standard deviations of color measurement are shown in Table 3. The Δ SGU of all bleaching techniques were statistically similar ($p > 0.58$) and different to the non-bleached control group ($p \leq 0.003$).

A statistically higher absolute risk of TS was observed for the groups bleached with CF, regardless of the application mode (Table 3). The CC 1-45 group was statistically different from the others experimental groups ($p = 0.04$) and similar to the control group ($p = 0.76$).

The scores for every criterion determined by the histological assessment of the specimens according to groups are shown in Table 4. Overall, the histological features showed that the pulp tissue observed in control group was quite different from the the experimental groups in which the teeth were bleached ($p = 0.0003$). Teeth from the control group showed pulp tissue with normal histological features, which were characterized by the presence of continuous odontoblast layer as well as defined cell-free zone and cell-rich zone. No inflammatory pulp reaction or tissue disorganization was observed (Figure 1A/B).

Four and five human incisors bleached with CF 3-15 and CF 1-45, respectively, exhibited large zone of coagulation necrosis in the coronary pulp tissue associated to deposition of tertiary dentin (Figure 2A to D and 3A to D). In one and two of those five teeth bleached with CF 3-15 and CF 1-45 respectively, the reparative dentin adjacent to the necrotic tissue and the reactionary dentin observed in the lateral walls of the

coronary pulp chamber was continuous to that deposited in the root pulp chamber (Figures 2A to D and 3A to D). In nine of those ten teeth bleached with a gel CF, a mild inflammatory response mediated by mononuclear cells among dilated and congested blood vessels was observed (Figure 2A to D and 3A to D).

In five teeth bleached with CC 1-45, the mild inflammatory pulp response was mediated by mononuclear cells. In this CC 1-45 group, two teeth did not present necrosis; however, a moderate deposition of reactionary dentin which was underlined by discontinuous odontoblast layer was observed around the coronary and root pulp tissue and in the upper part of the pulpal horn (Figure 4A to D).

Discussion

Although the main goal of this study was to measure the human pulpal responses to different bleaching techniques, the bleaching efficacy and TS was also assessed to verify if the bleaching agent was effective in producing a whitening effect and the likely side effect of the protocols evaluated.

Two recently published studies compared the bleaching efficacy (BE) and TS of a three 15-min application vs. a single 45-min application of a 35% HP (Matis et al., 2009; Reis et al., 2011). These studies showed that a single 45-min application were effective in terms of bleaching, however with a slightly lower bleaching speed and a slightly higher TS (Matis et al., 2009; Reis et al., 2011). Although in the present study no significant differences in terms of color change and TS was detected for the two application modes, this study was not planned for the analysis of clinical findings but for the histopathological investigation of human dental pulps. However, the BE and TS in the present study was only performed in one session and this was different in comparison with those previous studies (Matis et al., 2009; Reis et al., 2011).

The histological response of the calcium-free bleaching gel (CF) submitted to both application modes showed sites of pulp necrosis and the presence of a mild inflammatory response mediated by mononuclear cells and congested blood vessels as already demonstrated in an earlier study (Costa et al. 2010). It has been demonstrated HP and the products of its degradation, such as hydroxyl (OH⁻) ions may act as free radicals to cause oxidative stress in the pulp cells (Kawamoto, Tsujimoto, 2004). The increase of reactive oxygen specimen levels cause deleterious effects to several cell components, like mutagenesis, carcinogenesis, cell membrane damage by peroxidation

lipid, and protein fragmentation (Sies, 1993; Martindale, Holbrook, 2002), which may reduce cell proliferation and result in cell necrosis or apoptosis (Slater et al., 1995; Allen, Tresini, 2000; Trindade et al., 2009; Ribeiro et al., 2009).

Contrary to our previous expectation, no significant difference was observed between the two modes of HP application and thus the histopathological signs of dental pulps do not explain the slightly higher TS of the single 45-min application mode reported in earlier clinical trials (Matis et al., 2009; Reis et al., 2011). Although the damage caused by pulp cells were similar it is still unknown if the expression of inflammatory mediators that leads to pain and symptoms of neurogenic inflammation such as bradykinin (Lepinski et al., 2000) and the substance-P (Rodd, Boissonnade, 2000; Caviedes-Bucheli et al., 2008) have different expressions under these two application modes. Therefore, imunohistochemical studies should be further conducted in order to investigate the expression of inflammatory mediators in pulp tissues of teeth submitted to different bleaching protocols.

When it comes to the comparison of the different bleaching products, no statistical difference between the CF and CC products were observed, which seems that the HP concentration, which was the same in all experimental groups, may play the most important role on the damage caused to the human pulp tissue. However, it is worth mentioning that the scores employed for categorization of the histopathological events were not discriminative enough to detect some subtle differences that could be observed during the histopathological analysis what resulted in statistically similar results. Some important differences could be seen in the pulps of teeth bleached with CC product. For instance, 60% of the teeth bleached with CC 1-45

exhibited signs of pulp necrosis, while 80% of the teeth bleached with CF showed pulp necrosis. The features of these necrosis sites were also different. While in the former only narrow and superficial areas of necrosis were observed, larger areas of necrosis involving the whole pulp horns were seen for the latter product. This might indicate that some features of the CC gel might have prevented more detrimental effects on the pulp tissue.

One important difference between the CC and CF products is that the former contains 2% calcium gluconate that was added to the bleaching gel with the aim to prevent enamel demineralization and manufacturer's claims that the addition of this product might have played a role on the lower tooth sensitivity reported by the calcium-containing products. Perhaps, the 2% of calcium gluconate dissolved into the HP gel was able to decrease dentin permeability and block enamel surface defects, similarly to what is believed to occur with amorphous calcium phosphate containing bleaching gels (Giniger et al., 2005) or calcium gluconate (Kossatz et al., 2012). This might reduce the rate of HP penetration in the pulp tissue as well as provide more time for the pulp cells to produce enough peroxidases, catalases (Bowles, Burnes, 1992) and oxygenases (Anderson et al., 1999) to protect the connective pulp tissue from the immediate damage caused by HP.

Another important difference is that CC product keeps the pH high and stable (pH = 8.0 – 9.0) throughout the bleaching procedure which allows them to be used in a single 45-minute application protocol. Most of the in-office bleaching gels are delivered in low pH (2.4 to 6.5) (Price et al., 2000; Freire et al., 2009) to allow them to be stored for prolonged periods (Chen et al., 1993). The CF gel has a pH of 6-7

immediately after mixing and may reach a pH of 5 after 45 min in contact with the dental structure (Marson et al., 2008b).

The decomposition kinetics and the by-products produced by HP depend on the pH of the media, which may play a role on the prevalence and intensity of TS. In an acidic solution, higher concentration of hydroxyl anions (OH^-) are produced; however in an alkaline media there is a higher concentration of perhydroxyl ions (HOO^-) (Suh, 2000). These differences may explain the lower pulpal damage caused by CC 1-45 and the lower TS rates reported in a clinical trial for this product (Kossatz et al., 2012). This also may explain why a single 45-min application of CF product led to higher TS rates in earlier clinical trials (Matis et al., 2009; Reis et al., 2011).

From a clinical standpoint, the results of this study should be interpreted with caution. Whether or not the pulp damage caused by higher concentration of HP is reversible is yet to be addressed. Besides that, to the extent of the author's knowledge, no clinical study has reported pulp death after in-office bleaching and thus further studies evaluating pulp vitality at long-term after in-office bleaching should be conducted. In addition, future studies should be encouraged in order to elucidate if calcium-containing products, as employed in this study, but in lower HP concentrations produce the same damage to the pulp tissue.

One limitation of this in vivo study is that the participants were young. It is known that teeth from young patients present wider dentinal tubules and thinner dentin layer as none of little secondary dentin has been deposited. Therefore, it is expected that higher amount of HP or other reactive oxygen species may diffuse faster through enamel and dentin to cause damage to the pulp tissue. In this way, further in

vivo studies are needed to evaluate if similar pulpal damage, as demonstrated in the present investigation, also takes place in teeth of older patients submitted to in-office bleaching therapies.

Conclusion

Based upon the data obtained, it can be concluded that the calcium-free (Whiteness HP Maxx) 35%HP gel applied on enamel surface of lower human incisors cause intense pulp damage regardless of the mode of application. Lower pulp damage was produced by the calcium-containing (Whiteness HP Blue) 35%HP gel which also caused less tooth sensitivity than that observed for calcium-free 35%HP gel.

Acknowledgements

This study was performed by Douglas Augusto Roderjan as partial fulfillment of his PhD's degree at the State University of Ponta Grossa (UEPG), Ponta Grossa, PR, Brazil. The authors would like to thanks FGM Dental Products for the generous donation of all products used in this study. This study was partially supported by National Council for Scientific and Technological Development under grants 301937/2009-5; 301891/2010-9; and 301291/2010-1.

References

1. Auschill TM, Hellwig E, Schmidale S, Sculean A, Arweiler NB. Efficacy, side-effects and patients' acceptance of different bleaching techniques (OTC, in-office, at-home). *Oper Dent*. 2005; 30(2):156-63.
2. de Silva Gottardi M, Brackett MG, Haywood VB. Number of in-office light-activated bleaching treatments needed to achieve patient satisfaction. *Quintessence Int*. 2006 Feb;37(2):115-20.
3. Zekonis R, Matis BA, Cochran MA, Al Shetri SE, Eckert GJ, Carlson TJ. Clinical evaluation of in-office and at-home bleaching treatments. *Oper Dent*. 2003; 28(2):114-21.
4. Bernardon JK, Sartori N, Ballarin A, Perdigão J, Lopes GC, Baratieri LN. Clinical performance of vital bleaching techniques. *Oper Dent*. 2010; 35(1):3-10.
5. da Costa JB, McPharlin R, Paravina RD, Ferracane JL. Comparison of at-home and in-office tooth whitening using a novel shade guide. *Oper Dent*. 2010; 35(4):381-8.
6. Marson FC, Sensi LG, Vieira LC, Araújo E. Clinical evaluation of in-office dental bleaching treatments with and without the use of light-activation sources. *Oper Dent*. 2008a; 33(1):15-22.
7. Tay LY, Kose C, Loguercio AD, Reis A. Assessing the effect of a desensitizing agent used before in-office tooth bleaching. *J Am Dent Assoc*. 2009; 140(10):1245-51.
8. Kossatz S, Dalanhol AP, Cunha T, Loguercio A, Reis A. Effect of light activation on tooth sensitivity after in-office bleaching. *Oper Dent*. 2011; 36(3):251-7.
9. Reis A, Tay LY, Herrera DR, Kossatz S, Loguercio AD. Clinical effects of prolonged application time of an in-office bleaching gel. *Oper Dent*. 2011; 36(6):590-6.
10. Cooper JS, Bokmeyer TJ, Bowles WH. Penetration of the pulp chamber by carbamide peroxide bleaching agents. *J Endod*. 1992; 18(7):315-7.
11. 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.
12. Benetti AR, Valera MC, Mancini MNG, Miranda CB, Baldicci I. *In vitro* penetration of bleaching agents into the pulp chamber. *Int Endod J*. 2004;37(2):120-4.
13. Sulieman M, Addy M, MacDonald E, Rees JS. The effect of hydrogen peroxide concentration on the outcome of tooth whitening: an in vitro study. *J Dent*. 2004; 32(4) 295-9.
14. Gökyay O, Müjdeci A, Algin E. In vitro peroxide penetration into the pulp chamber from newer bleaching products. *Int Endod J*. 2005; 38(8):516-20.
15. Markowitz K. Pretty painful: why does tooth bleaching hurt? *Med Hypotheses*. 2010; 74(5):835-40.
16. Anderson DG, Chiego DJ Jr, Glickman GN, McCauley LK. A clinical assessment of the effects of 10% carbamide peroxide gel on human pulp tissue. *J Endod*. 1999; 25(4):247-50.
17. Fugaro JO, Nordahl I, Fugaro OJ, Matis BA, Mjör IA. Pulp reaction to vital bleaching. *Oper Dent* 2004; 29(4) 363-8.
18. Costa CAS, Riehl H, Kina JF, Sacono NT, Hebling J. Human pulp responses to in-office tooth bleaching. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2010; 109(4):e59-64.
19. Trindade FZ, Ribeiro AP, Sacono NT, Oliveira CF, Lessa FC, Hebling J, Costa CAS. Trans-enamel and trans-dentinal cytotoxic effects of a 35% H₂O₂ bleaching gel on cultured odontoblast cell lines after consecutive applications. *Int Endod J*. 2009; 42(6):516-24.
20. Dias Ribeiro AP, Sacono NT, Lessa FC, Nogueira I, Coldebella CR, Hebling J, de Souza Costa CAS. 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.

21. Coldebella CR, Ribeiro AP, Sacono NT, Trindade FZ, Hebling J, Costa CAS. Indirect cytotoxicity of a 35% hydrogen peroxide bleaching gel on cultured odontoblast-like cells. *Braz Dent J.* 2009;20(4):267-74.
22. Matis BA, Cochran MA, Eckert GJ, Matis JI. In vivo study of two carbamide peroxide gels with different desensitizing agents. *Oper Dent.* 2007; 32(6):549-555.
23. Browning WD, Chan DC, Myers ML, Brackett WW, Brackett MG, Pashley DH. Comparison of traditional and low sensitivity whiteners. *Oper Dent.* 2008;33(4):379-385.
24. Gallo JR, Burgess JO, Ripps AH, Bell MJ, Mercante DE, Davidson JM. Evaluation of 30% carbamide peroxide at-home bleaching gels with and without potassium nitrate--a pilot study. *Quintessence Int.* 2009;40(4):e1-6.
25. Giniger M, Macdonald J, Ziemba S, Felix H. The clinical performance of professionally dispensed bleaching gel with added amorphous calcium phosphate. *J Am Dent Assoc.* 2005; 136(3):383-392.
26. Kossatz S, Martins GC, Loguercio AD, Reis A. Tooth sensitivity and bleaching effectiveness of a calcium-containing in-office bleaching gel. *J Am Dent Assoc., in press,* 2012.
27. Price RB, Sedarous M, Hiltz GS. The pH of tooth-whitening products *J Can Dent Assoc.* 2000; 66(8) 421-6.
28. Freire A, Archegas LR, de Souza EM, Vieira S. Effect of storage temperature on pH of in-office and at-home dental bleaching agents *Acta Odontol Latinoam.* 2009; 22(1) 27-31.
29. Matis BA, Cochran MA, Wang G, Eckert GJ. A clinical evaluation of two in-office bleaching regimens with and without tray bleaching. *Oper Dent.* 2009; 34(2):142-9.
30. Costa CAS, Teixeira HM, Nascimento ABL, Hebling J. Biocompatibility of resin-based materials applied as liners in deep cavities prepared in human teeth. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2007;81(1):175-84.
31. Accorinte ML, Loguercio AD, Reis A, Costa CAS. Response of human pulps capped with different self-etch adhesive systems. *Clin Oral Investig.* 2008; 12(2):119-27.
32. Kawamoto K, Tsujimoto Y. Effects of the hydroxyl radical and hydrogen peroxide on tooth bleaching. *J Endod.* 2004;30(1):45-50.
33. Sies H. Strategies of antioxidant defense. *Eur J Biochem.* 1993; 215(2):213-9.
34. Martindale JL, Holbrook NJ. Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival. *J Cell Physiol.* 2002; 192(1):1-15.
35. Slater AF, Stefan C, Nobel I, van den Dobbelen DJ, Orrenius S. Signalling mechanisms and oxidative stress in apoptosis. *Toxicol Lett.* 1995;82-83:149-53.
36. Allen RG, Tresini M. Oxidative stress and gene regulation. *Free Radic Biol Med.* 2000; 28(3):463-99.
37. Lepinski AM, Hargreaves KM, Goodis HE, Bowles WR. Bradykinin levels in dental pulp by microdialysis. *J Endod.* 2000; 26(12):744-7.
38. Rodd H, Boissonnade F. Substance P expression in human tooth pulp in relation to caries and pain experience. *Eur J Oral Sci.* 2000; 108(6):467-74.
39. Caviedes-Bucheli J, Ariza-Garcia G, Restrepo-Mendez S, Ríos-Osorio N, Lombana N, Muñoz HR. The effect of tooth bleaching on substance P expression in human dental pulp. *J Endod.* 2008;34(12):1462-5.
40. Bowles WH, Burns H Jr. Catalase/peroxidase activity in dental pulp. *J Endod.* 1992; 18(11):527-34.
41. Chen JH, Xu JW, Shing CX. Decomposition rate of hydrogen peroxide bleaching agents under various chemical and physical conditions *J Prosthet Dent.* 1993; 69(1) 46-48.

42. Marson FC, Sensi LG, Reis R. New concept for the in-office bleaching technique. Rev Dent Press Estet 2008b; 5(1) 55-66.
43. Sun G. The role of lasers in cosmetic dentistry Dent Clin North Am. 2000; 44(4): 831-50.

Table 1 – Product composition, technique (code) and application regimes.

Product composition		Technique (code)	Application regimes
Whiteness Maxx 35%	HP 35% hydrogen peroxide, thickeners, dye mixture, glycol, inorganic load and deionized water	Three 15-min applications (CF 3-15)	<ol style="list-style-type: none"> For the bleaching of each tooth, three drops of phase 1 (hydrogen peroxide) should be mixed with one drop of phase 2 (thickener). Application of a thin layer of gel, approximately 0.5 mm thick, on the buccal surface of all teeth undergoing treatment. The bleaching gel should be left on the teeth surface for 15 min and then removed with an aspirator. This procedure should be repeated 3 times.
		A single 45-min application (CF 1-45)	<ol style="list-style-type: none"> For the bleaching of each tooth, three drops of phase 1 (hydrogen peroxide) should be mixed with one drop of phase 2 (thickener). Application of a thin layer of gel, approximately 0.5 mm thick, on the buccal surface of all teeth undergoing treatment. The bleaching gel should be left on the teeth surface for 45 min and then removed with an aspirator. This procedure was not repeated.
Whiteness Blue 35%	HP 35% hydrogen peroxide, thickeners, dye mixture, glycol, inorganic load, calcium and deionized water	A single 45-min application (CC 1-45)	<ol style="list-style-type: none"> For the bleaching of each tooth, two syringes (hydrogen peroxide and thickener) were connected and mixed for several times. Application of a thin layer of gel, approximately 0.5 mm thick, on the buccal surface of all teeth undergoing treatment. The bleaching gel should be left on the teeth surface for 45 min and then removed with an aspirator. This procedure was not repeated.

Table 2 - Scores used during the histological examination: inflammatory cell response, tissue disorganization and reactionary dentin formation.

Score	INFLAMMATORY CELL RESPONSE
	Characterization
0	None or a few scattered inflammatory cells present in the pulp area corresponding to the buccal surface of the tooth in which the bleaching gel was applied
1	Mild inflammatory cell infiltrate with polymorphonuclear or mononuclear leukocytes
2	Moderate inflammatory cell infiltrate
3	Severe inflammatory cell infiltrate
Score	TISSUE DISORGANIZATION
	Characterization
0	Normal pulp tissue
1	Pulp zones (odontoblast, acellular, and cell-rich) disorganization in the buccal surface of the tooth in which the bleaching gel was applied
2	Coronary pulp tissue disorganization with partial local necrosis
3	Intense pulp disorganization with necrosis in the coronay and root pulp tissue
Score	TERTIARY DENTIN FORMATION
	Characterization
0	Absence
1	Modest hard tissue deposition in coronary pulp of the tooth in which the bleaching gel was applied
2	Moderate hard tissue deposition in the coronay pulp tissue of the tooth in which the bleaching gel was applied
3	Intense hard tissue deposition in the coronay and root pulp tissue

Table 3 – Means \pm standard deviations and medians and interquartile range of shade guide units and Δ SGU for the experimental groups as well as the number of patients with tooth sensitivity (TS) for each group.

Groups	Shade guide unit				Δ SGU (*)	Tooth Sensitivity	
	Before		After				
	Mean \pm SD	Median (1 st /3 rd interquartile ranges)	Mean \pm SD	Median (1 st /3 rd interquartile ranges)			
Control	6.0 \pm 3.0	5 (5/9)	6.0 \pm 3.0	5 (5/9)	0.0 \pm 0.0	0 (5/9) A	2/0 a
CF 3-15	6.0 \pm 2.0	5 (5/5)	3.5 \pm 1.7	3.5 (2/5)	2.5 \pm 1.7	3 (3/3)B	5/5 b
CF 1-45	6.6 \pm 2.2	5 (5/9)	3.8 \pm 1.6	5 (2/5)	2.8 \pm 1.6	3 (3/4)B	5/5 b
CC 1-45	7.4 \pm 2.2	9 (5/9)	4.4 \pm 1.3	5 (5/5)	3.0 \pm 1.7	4 (3/4) B	5/1 a

(*) Similar upper case letters indicate statistically similar groups for Δ SGU (Mann-Whitney test, $p > 0.05$). (**) Similar lower case letters indicate statistically similar groups for TS (Fisher's exact, test $p > 0.05$).

Table 4 - Number of specimens for each group in each criterion as well as multiple comparisons among the experimental conditions.

Groups	Criteria															Overall Median (*)
	Inflammatory cell response					Tissue disorganization					Tertiary dentin formation					
	0	1	2	3	Median	0	1	2	3	Median	0	1	2	3	Median	
Control	2	0	0	0	0	2	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0 B
CF 3-15	0	5	0	0	1	0	1	4	0	2	0	0	4	1	2	2 A
CF 1-45	0	4	1	0	1	0	1	4	0	2	0	0	5	0	2	2 A
CC 1-45	0	5	0	0	1	0	2	3	0	2	0	2	3	0	2	2 A

(*) Kruskal-Wallis and Mann-Whitney test. Different letters mean significant differences ($p < 0.05$).

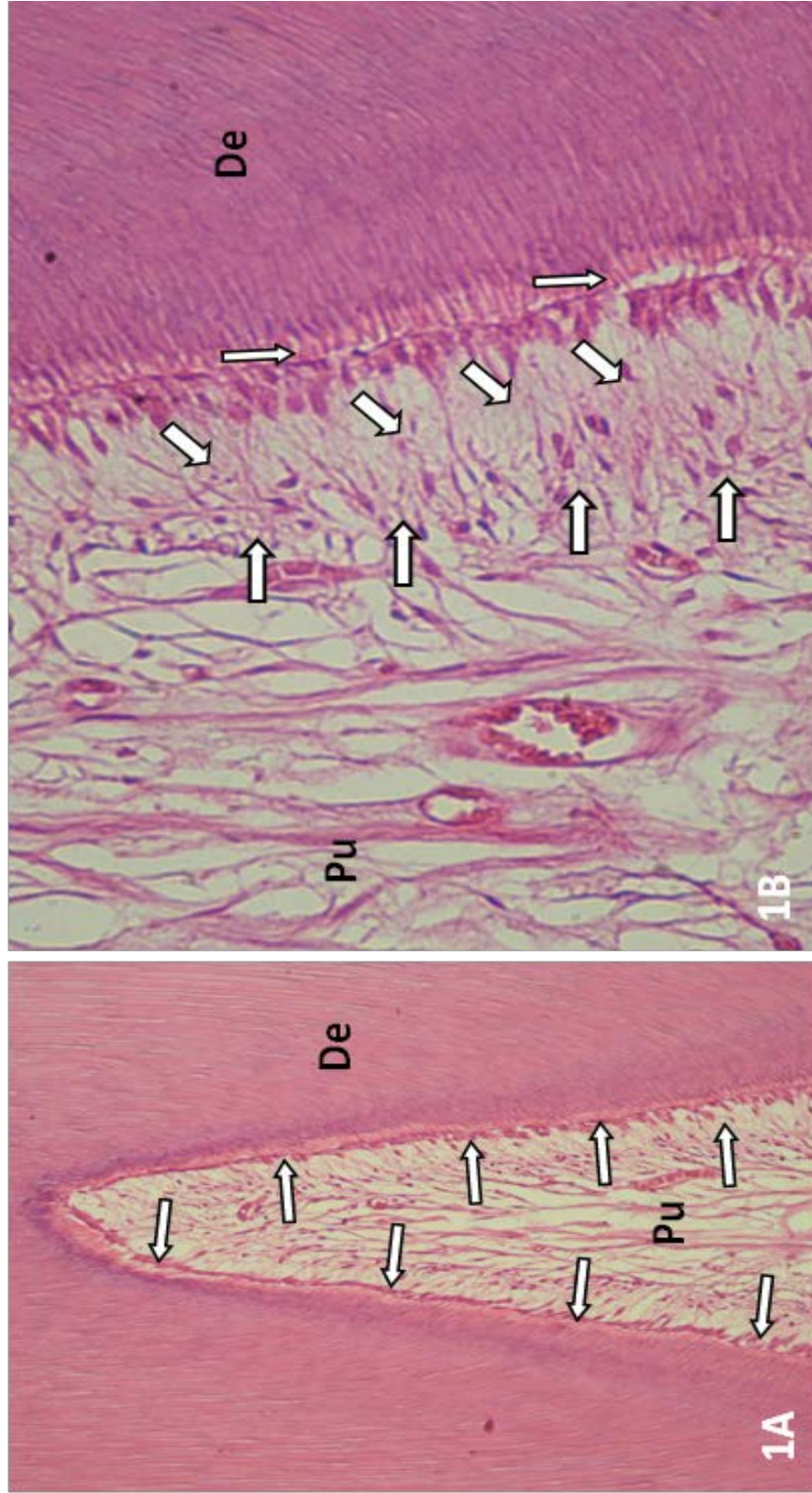


Figure 1: Intact control. A – General view of the coronary pulp chamber (Pu). A thin layer of pre-dentin is present between the continuous odontoblast layer (arrows) and the tubular dentin (De). H/E, 64x. **B** – Detail of figure 1A. Note the tubular dentin (De), pre-dentin (vertical arrow) underlined by a continuous odontoblast layer, the cell-free zone (oblique arrows), cell-rich zone (horizontal arrows) and the central zone of the pulp tissue (Pu) with normal histological characteristics. H/E, 250x.

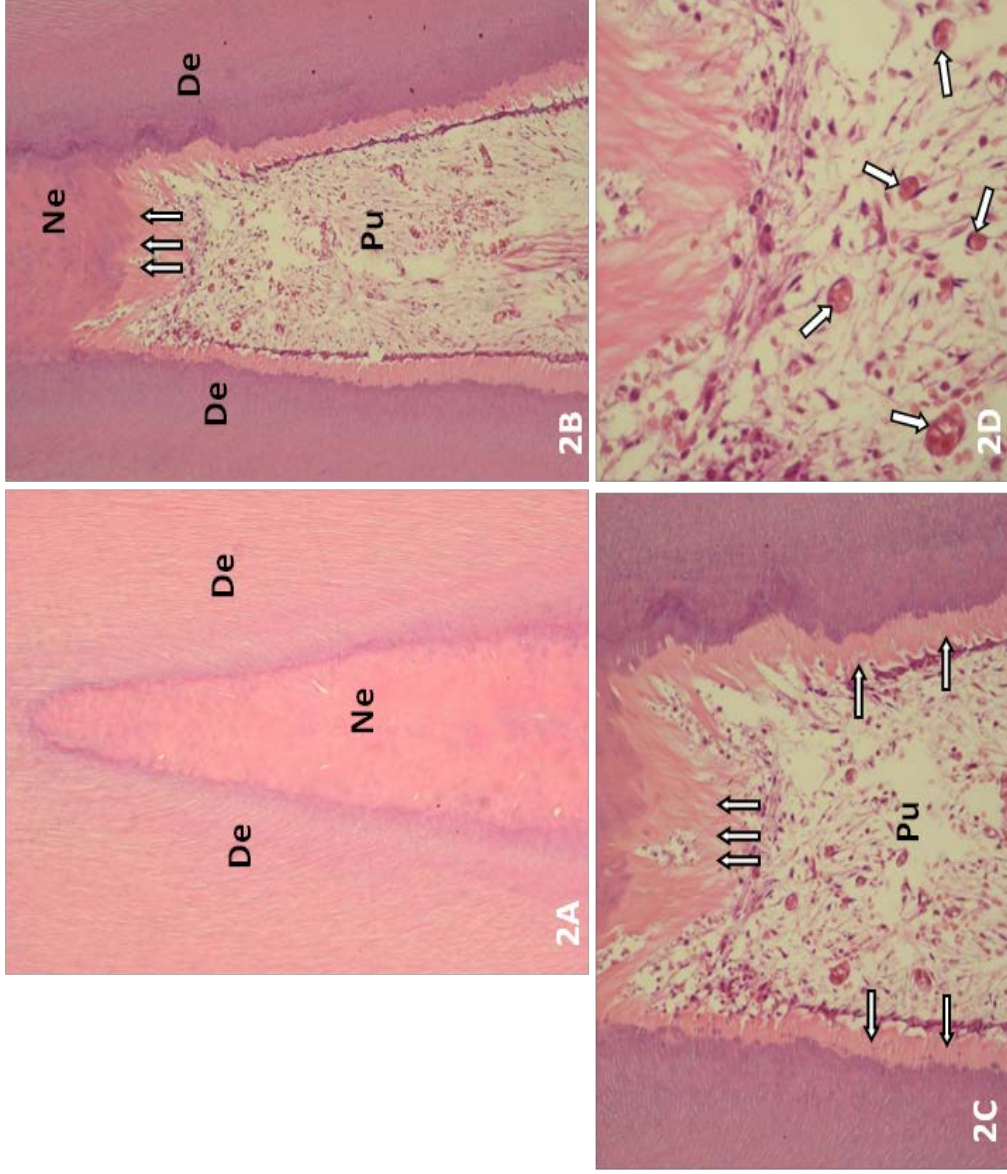


Figure 2: CF 3-15. A – Note the large necrosis (Ne) in the coronary pulp chamber. H/E, 32x. **B** – Subjacent to the necrotic zone heterogeneous reparative dentin is observed (arrows). H/E, 64x. **C** – Detail of figure 2B. Note the reparative dentin (vertical arrows) as well as the layer of reactionary dentin deposited in the lateral walls of pulp chamber (horizontal arrows). H/E, 125x. **D** – Detail of figure 2C. The pulp tissue (Pu) exhibits discrete inflammatory response mediated by mononuclear cells among a number of congested blood vessels (arrows). H/E, 250x. (De = Dentin).

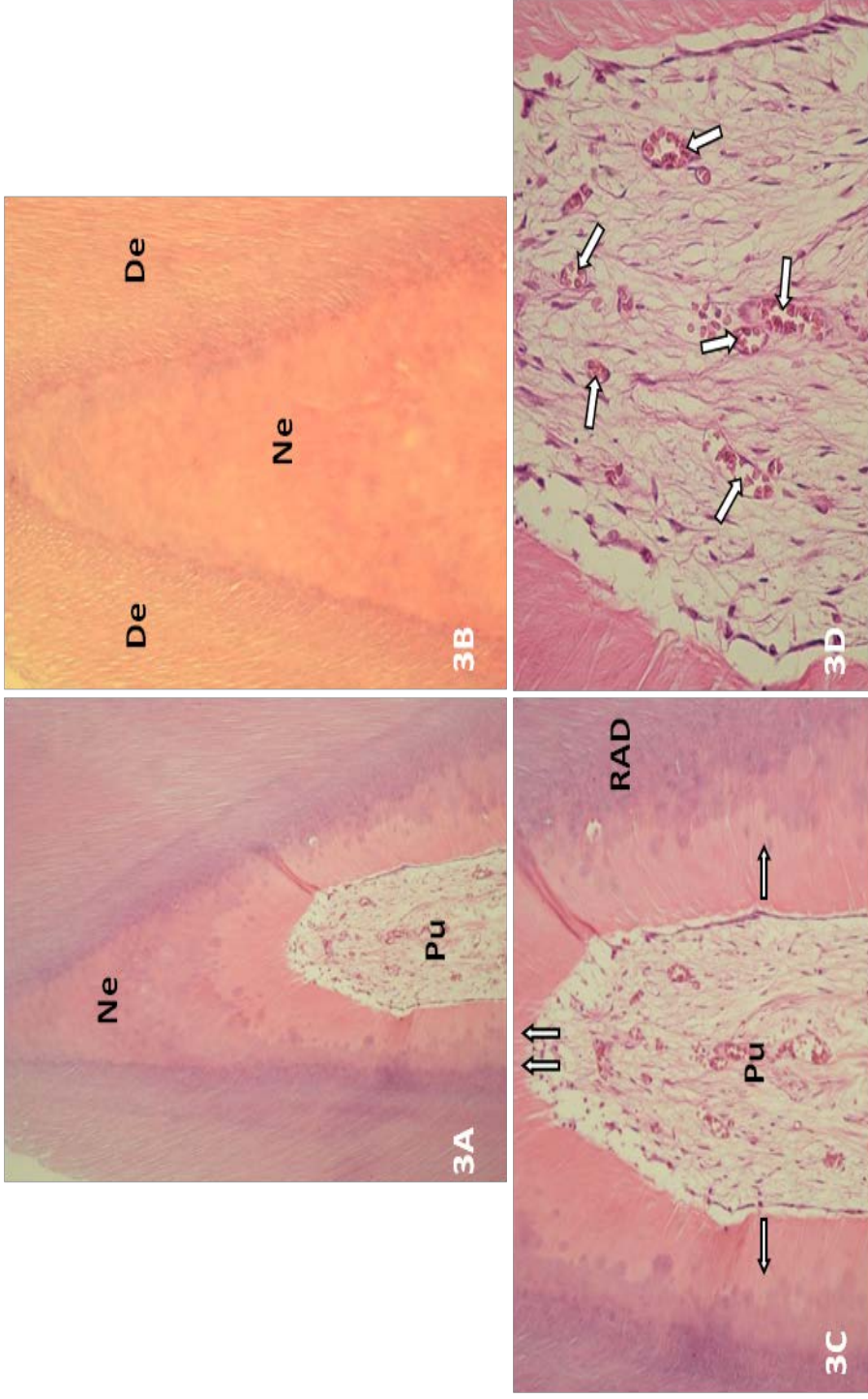


Figure 3: CF 1-45. A – General view of the coronary pulp tissue partially necrotic (Ne). H/E, 32x. **B** – Note the large necrotic area (Ne) in the coronary pulp chamber. H/E, 64x. **C** – Detail of figure 3A. The reparative dentin (vertical arrows) subjacent to the necrotic tissue is continuous with the thick reactionary dentin (RAD) deposited in the lateral walls of the pulp chamber (Pu). H/E, 125x. **D** – Detail of figure 3C. The pulp tissue exhibits discrete inflammatory response mediated by mononuclear cells among a number of congested blood vessels (arrows). H/E, 250x. (De = Dentin).

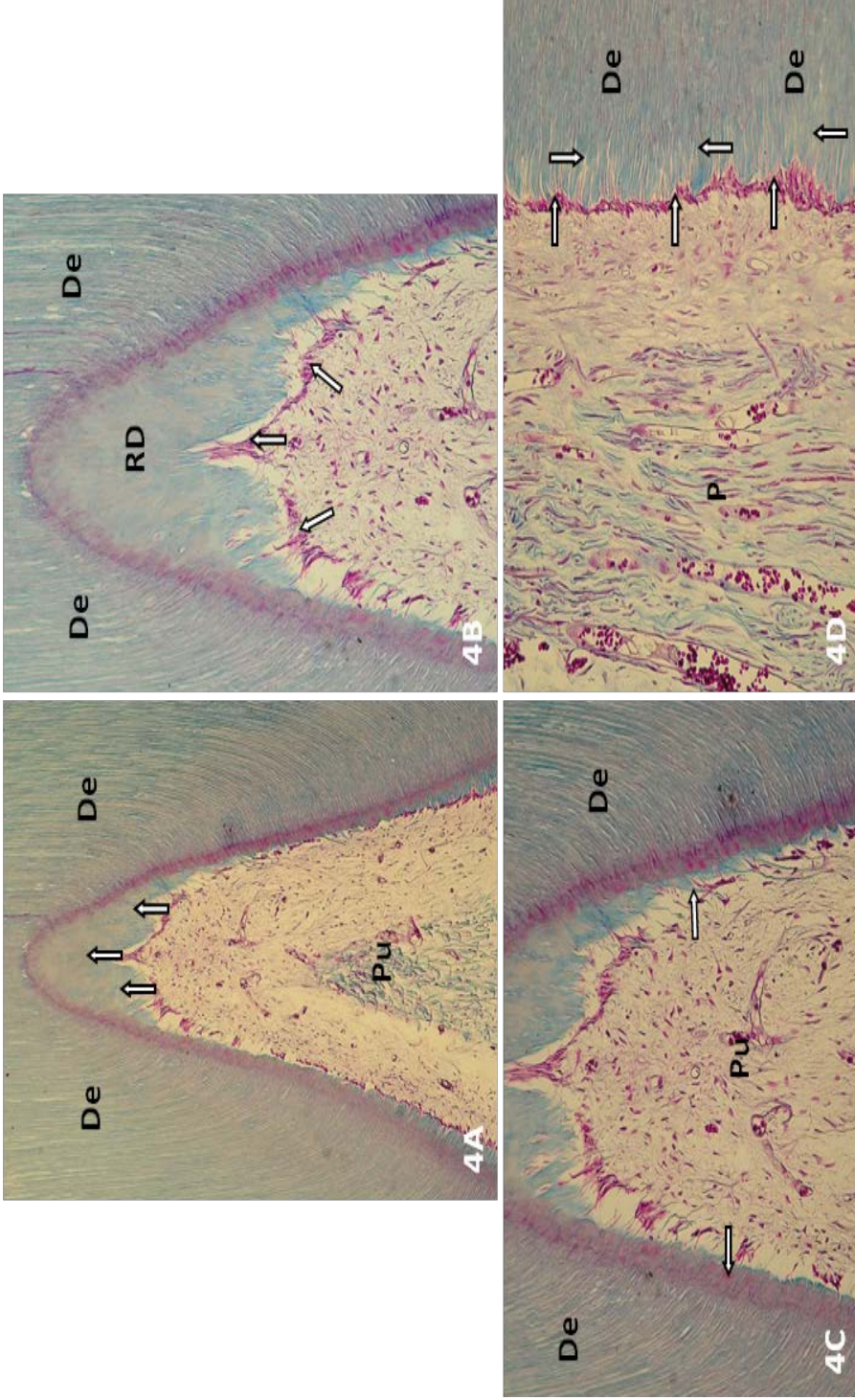


Figure 4: CC 1-45. **A** – General view of the coronary pulp tissue. Note the deposition of reactionary dentin mainly in the tip of pulp horn (arrows). Masson's trichrome, 32x. **B** – Detail of figure 4A. Note the tubular reactionary dentin (RD) deposited by the odontoblasts (arrows). Masson's trichrome, 64x. **C** – Detail of figure 4A. A thin layer of reactionary dentin is also observed in the lateral walls of the pulp chamber (arrows). Masson's trichrome, 125x. **D** – Root pulp tissue. Note the continuous odontoblast layer (horizontal arrows) underlying the tubular reactionary dentin (vertical arrows). The central part of the root pulp tissue exhibits dense collagen fibers and fibroblasts parallel to blood vessels. Masson's trichrome, 250x. (De = Dentin).

5.3 Artigo nº 3

Effect of in-office bleaching on pulp tissue of human incisors of young and older patients

Douglas A. Roderjan¹ [DDS, MS, PhD student]; Rodrigo Stanislawczuk¹ [DDS, MS, PhD student]; Josimeri Hebling² [DDS, MS, PhD]; Carlos A. de Souza Costa³ [DDS, MS, PhD]; Alessandra Reis¹ [DDS, PhD]; Alessandro D. Loguercio¹ [DDS, MS, PhD]

¹ Department of Restorative Dentistry, School of Dentistry, State University of Ponta Grossa, Ponta Grossa/PR, Brazil.

² Department of Orthodontics and Pediatric Dentistry, School of Dentistry, Univ. Estadual Paulista, Araraquara/SP, Brazil.

³ Department of Physiology and Pathology, School of Dentistry, Univ. Estadual Paulista, Araraquara/SP, Brazil.

Running title: Human pulp responses to in-office bleaching

To be submitted to publication: Journal of Dentistry

Corresponding Author:

Alessandro D. Loguercio
Universidade Estadual de Ponta Grossa – Mestrado em Odontologia
Rua Carlos Cavalcanti, 4748, Bloco M, Sala 64A, Uvaranas, Ponta Grossa, Paraná, Brazil
84030-900; e-mail: aloguercio@hotmail.com

Abstract

Objectives: This study evaluated the response of pulps of human incisors from young and older patients submitted to in-office bleaching with 35% of hydrogen peroxide.

Methods: A 35% hydrogen peroxide gel was applied on the buccal surface of human incisors from young [BYT, n=5] and older [BOT, n=4] patients. As controls, non-bleached human incisors from young [CYT, n=4] and older [COT, n=4] patients were employed. The color was registered at baseline and 2 days after the protocol using a value-oriented shade guide. The tooth sensitivity (TS) experience (yes/not) was also recorded during the two days post-bleaching. Bleached and non-bleached [control] human incisors were extracted 2 days after the bleaching procedure and subjected to histological analysis. Color change and overall scores from histological evaluation was evaluated by Kruskal-Wallis and Mann-Whitney tests. TS was evaluated by Fisher's exact test ($\alpha=0.05$). The thickness of the dentin was recorded and evaluated by ANOVA and Tukey's tests.

Results: The thickness of dentin from young and old patients differed significantly ($p<0.05$). Color change and TS was only observed in the bleaching groups ($p<0.05$). In both experimental groups, the coronary pulp tissue exhibited partial necrosis associated to reactionary dentin deposition. The subjacent pulp tissue exhibited mild inflammatory response.

Conclusions: Bleaching with 35% hydrogen peroxide caused pulp damage, characterized by partial necrosis, reactionary dentin deposition and mild inflammation regardless of the age of the patient.

Introduction

In-office bleaching has become more widely accepted mainly because of the intolerance of some patients to the use of at-home bleaching trays as well as their desire to achieve more immediate results (Haywood, Heymann, 1989; Barghi, 1998).

In spite of the clinical success of in-office bleaching, when applied in more than one clinical session (Giachetti et al., 2010; Tay et al., 2012), a very common side effect experienced by patients is the tooth sensitivity (TS), which affects up to 87% of patients in clinical trials (Marson et al., 2008; Kossatz et al., 2011; Reis et al., 2011; Almeida et al., 2012).

Although this adverse effect is usually considered temporary and mild, it can produce considerable discomfort to the patient (Jorgensen, Carroll, 2002; Leonard et al., 2007). A recent study has reported that the pulp damage produced by hydrogen peroxide (HP) gels is dependent on the tooth type where the product is applied (Costa et al., 2010). While necrosis were observed in the pulps of mandibular central incisors after application of a 38% HP in-office bleaching gel (Costa et al., 2010), only a mild inflammatory reaction was observed in the pulps of premolars.

The authors attributed these findings to the thinner layer of enamel and dentin presented in the mandibular incisors as compared with that of premolars. It is likely that the thinner the hard dental structure, the faster is the passage of HP to the pulp (Costa et al. 2010). This allows less time for the production and release of protective enzymes against damage by HP and is suggestive that the extent of the damage produced by HP is related to the thickness of the hard dental tissues.

A similar condition occurs as the patient ages. Over time, there is continuous deposition of dentin, which increases the thickness of dentin, as well as, decreases the diameter of dentinal tubules (Morse, 1991; Murray et al., 2002). Both physiologic mechanisms decreases dentin permeability (Pashley, 1985; Mjör, 2009) and may reduce the amount and the rate of HP diffusion to the pulp tissue, likely reducing the pulp damage produced by such oxidizing product. Whether or not this has a protective role against the damage produced by HP on the pulp tissue is yet to be addressed.

Therefore, the aim of this study was to evaluate the response of pulps of human incisors from young and older patients submitted to in-office bleaching with 35% hydrogen peroxide gel.

Materials and Methods

Experimental design. This clinical investigation was approved by the Ethics Committee from the local university under protocol number 09171/10. Based on pre-established criteria, 18 participants with lower incisors scheduled to be extracted for orthodontic or periodontal reasons were selected for this study. Half of the selected participants should be young (age ranging from 18 to 30 years) while the other half should be from older participants (age equal or higher than 50 years). Each group of participants (young [YT] and old [OT]) were divided in two groups: the bleached one (B) and the control (C), where no bleaching was performed.

Inclusion and exclusion criteria. All the participants had the lower incisors with initial shade A2 or darker as judged by comparison with a value-oriented shade guide (Vita Lumin, Vita Zahnfabrik, Bad Säckingen, Germany). Two weeks before the bleaching procedures, all the subjects received a dental screening and dental prophylaxis. The diagnosis of pulp sensitivity was performed by a cold test application (Endo-Frost, Roeko, Germany). After 10 s of cold application, all participants should answer positively indicating few and not lingering pain response. This was considered evidence of pulp vitality.

Participants included in this clinical study had good general and oral health. The participants had at least one caries-free mandibular incisor, without restorations and in need of extraction due to orthodontic (young participants) or periodontal reasons (older participants). Participants that had undergone tooth-whitening procedures and presenting anterior restorations were excluded from the study. Pregnant/lactating women, patients with severe internal tooth discoloration (tetracycline stains, fluorosis,

pulpless teeth), participants with bruxism habits or any gross pathology in the mouth were also excluded from the study. Participants using any continuous drug with anti-inflammatory and antioxidant action were also excluded. Participants were asked if the tooth presented TS one week before the beginning of the bleaching therapy. Those who reported any degree of spontaneous TS were not included in the study sample.

Bleaching protocol. After the prophylaxis procedures, the gingival tissue of the teeth to be bleached was isolated with a light-cured gingival barrier (Top Dam, FGM Dental Products, Joinville, SC, Brazil). A 35% HP gel (Whiteness HP Maxx, FGM) was used according to the instructions described in Table 1.

Shade evaluation. The color was registered at baseline and two days after the bleaching session using a value-oriented shade guide (Vita Lumin, Vita Zahnfabrik). The shade guide's 16 tabs were arranged from highest (B1) to lowest (C4) value (B1*A1*B2*D2*A2*C1*C2*D4*A3*D3*B3* A3.5*B4*C3*A4*C4). Although this scale is not linear in the truest sense, we treated the changes as representing a continuous and approximately linear ranking for the purpose of analysis. The shade changes from the start of the active phase to the individual recall times were calculated by calculating the change in the number of shade guide units (Δ SGU) that occurred toward the lighter end of the value-oriented list of shade tabs. Only one calibrated and experienced evaluator recorded the shade of each subject's tooth at baseline and two days after the bleaching procedure. The measurement area of interest for shade matching was the middle third of the facial surface of teeth.

Tooth sensitivity evaluation. Two days after the procedure, the participants were asked if they had experienced any TS (yes/no answer) in the bleached tooth. No attempt was made to record the TS intensity.

Histological evaluation. This protocol followed the description of Costa et al. (2010). Two days after the bleaching procedure, the teeth were extracted under local anesthesia. The roots were immediately sectioned midway between the cement/enamel junction (CEJ) and the root tip with a high-speed hand-piece under water spray. The teeth were stored for 48 h in formalin fixative solution at pH 7.2, decalcified in buffered Morse's solution, dehydrated, vacuum-infiltrated with wax paraffin and finally embedded in paraffin. Six-micrometer thick serial sections were cut ("820" Spencer Microtome, Carson, CA, USA), mounted on glass slides and stained with hematoxylin and eosin (H/E).

Based upon previous in vivo studies (Costa et al., 2001; Accorinte et al., 2006), all sections obtained from the 18 teeth were submitted to evaluation by a calibrated examiner blinded to the groups. Using a light microscope (62774; Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) the histopathologic events described in Table 2 were assessed and classified by a descriptive analysis.

Dentin thickness measurement. Using a light microscope (Diastar; Cambridge Instruments, Buffalo, NY) adapted to a video camera (DXC-107A/107AP; Sony Electronics, Tokyo, Japan), 3 linear measures from the enamel/dentin junction to the pulp chamber were carried out to determine the dentin thickness (DT) of all sections of the each tooth. The video images were loaded into a computer and processed using standard software (Mocha; Jondel Scientific, San Rafael, CA). The methodology used in

the present study to measure the DT was similar to that previously used to determine the remaining dentin thickness between the cavity floor and the subjacent pulp tissue (Costa et al., 2006; Costa et al., 2007). The readings from each tooth were averaged to obtain an average DT of each tooth.

Statistical analysis. The Δ SGU of the groups were calculated and compared with the non-parametric Kruskal-Wallis and Mann-Whitney U-test. The TS among groups was evaluated by Fisher's exact test. The data regarding the DT were analyzed by ANOVA and Tukey's test. To evaluate the pulp response, three established histopathological events were analyzed (Table 2). Thus, 3 scores per tooth were considered for statistical analysis. The overall comparison of the groups was performed with the non-parametric Kruskal-Wallis and Mann-Whitney tests. All tests were performed with appropriately computed critical values ($\alpha = 0.05$).

Results

The age of the participants from the young group varied between 18 to 30 years old (mean 20.1 ± 4.3) while participants from the old varied between 54 to 62 years old (mean 58.2 ± 4.3).

The means/standard deviations and medians/interquartile ranges of Δ SGU are shown in Table 3. The Δ SGU was similar between teeth submitted to the bleaching protocol, regardless of the participant's mean age. A higher Δ SGU was observed in the bleached teeth than in control groups ($p = 0.001$).

A statistically higher TS was observed for the bleached groups, regardless of the participant age ($p = 0.003$; Table 3). In the control groups, the DT was measured from the enamel-dentin junction (EDJ) to the predentin. In experimental groups, the DT was measured from the EDJ to the calcium-traumatic line observed in the sections stained with H/E or Masson's Trichrome. The DTs obtained from all human incisors used in this study are shown in Table 4. Significant differences were only detected for the main factor age ($p = 0.001$). A statistically higher DT was observed in teeth from older participants.

The scores for every criterion determined by the histological assessment of the specimens according to groups are shown in Table 5. Overall, the teeth from both control groups showed pulp tissue with normal histological features, which were characterized by the presence of continuous odontoblast layer as well as defined cell-free zone and cell-rich zone. No inflammatory pulp reaction or tissue disorganization was observed (Figure 1a/b).

Two human incisors from the bleached OT group exhibited moderate pulp inflammation and tissue disorganization. One of these teeth (DT = 2.04 μm) presented intense deposition of tubular reactionary dentin in the tip of the pulp horn (Fig. 2a/b). In another tooth that presented DT of 2.12 μm , a moderate deposition of reactionary dentin was observed around the coronal and radicular pulp tissue (Fig. 2c/d). Partial coronal pulp necrosis occurred in three other bleached incisors.

All five young human incisors from bleached YT group presented partial necrosis of the coronal pulp tissue (Fig. 3a/b). The subjacent pulp exhibited discrete to moderate pulp inflammation and tissue disorganization. Three of these teeth showed moderate reactionary dentin below the coagulation necrosis which was continuous with that deposited in the radicular pulp.

Discussion

Although the main goal of the present study was to assess the pulp response after in-office bleaching, we also attempted to measure the color change and the prevalence of TS in order to confirm the bleaching effectiveness and the clinical symptoms associated to the procedure.

Both bleached groups demonstrated similar and significant tooth color enhancement. A variation of 2-3 SGU was observed between baseline and after-bleaching and this finding is in agreement with previous studies (Gottardi et al., 2006; Tay et al., 2009; Bernardon et al., 2010; Reis et al., 2011). Similarly, all bleached teeth reported TS, confirming that TS is a very prevalent side effect of in-office bleaching (Marson et al., 2008; Kossatz et al., 2011; Reis et al., 2011; Almeida et al., 2012).

It is likely that the bleaching-related TS is the result by hydrogen peroxide diffusion into the pulp during tooth bleaching (Cooper et al., 1992, Hanks et al., 1993, Benetti et al., 2004, Sulieman et al., 2004, Gökay et al., 2005) causing oxidative stress on pulp cells caused by the HP and its by-products (Kawamoto, Tsujimoto 2004), along with an inflammatory reaction and all of this is responsible for the tooth sensitivity (Markovitz et al., 2010).

Previous studies reported that the application of 35% HP produced direct damage to cultured odontoblast-like cells and a decrease of their metabolic activity (Dias Ribeiro et al., 2009; Trindade et al., 2009). These in vitro findings were also confirmed by an in vivo study (Costa et al., 2010). The authors observed sites of pulp necrosis in young lower incisors after a single clinical session of in-office bleaching (Costa et al., 2010).

The present investigation also observed similar findings regardless of the tooth, suggesting that the extent of the cell damage produced by HP is not dependent on the age of the tooth scheduled to be bleached.

One of the most obvious features of aging is a reduction in size of the pulp chamber, caused by the continual secretion of dentinal matrix by odontoblasts, (Solheim, 1992) known as, tertiary dentin matrix (Cox et al., 1992; Robertson et al., 1997). This tertiary dentin may be classified as reactionary or reparative in origin, depending on the severity of the initiating response and the conditions under which the newly deposited dentin matrix was formed (Lesot et al., 1994). The statistical difference in the DT of teeth from young and older participants of the present study indicates that the pathway to pulp chamber was longer in the latter due to the ageing process.

Thus, one could expect that this increase in DT associated to the decrease in permeability due to the deposition of peritubular dentin (Morse, 1991; Murray et al., 2002; Pashley, 1985; Mjör, 2009) in older teeth could aid additional pulp protection; however this was not supported by the findings of the present study.

Perhaps, DT may have a secondary role on pulp protection against damage by HP. According to several authors, information on odontoblast and other pulp cell densities is a very critical factor mediating the scale of pulp reparative responses (Murray et al., 2000; About et al., 2001; Murray et al., 2002). At the same time that ageing produces continuous dentinal deposition by odontoblasts, with an increase by around 15.5% of DT in older patients (more than 50 years) in comparison with young patients (10-30 years); this is accompanied by a 12% and 30% decrease in the density of odontoblasts and subodontoblasts/fibroblasts cells, respectively.

The reduced cell density possesses inferior secretory activity of peroxidases, catalases and oxygenases (Bowles, Burns, 1992; Anderson et al., 1999) to protect the pulp from the immediate damage caused by HP. Thus, the likely additional advantage of increased DT may be overwhelmed by the decrease reparative capacity of the pulp in older patients (Morse, 1991; Murray et al., 2002).

From a clinical standpoint, the results of this study should be interpreted with caution. Whether or not the pulp damage caused by HP is reversible is yet to be addressed. Besides that, one could not omit mentioning that to the extent of the author's knowledge, no clinical study has so far reported pulp death after in-office bleaching and thus further studies evaluating pulp vitality and features of pulp tissue at long-term after in-office bleaching should be conducted.

Conclusions

It may be concluded that 35% hydrogen peroxide in-office bleaching gels applied on lower human incisors cause pulpal damage, characterized by partial necrosis of coronary pulp tissue associated with reactionary dentin deposition and mild inflammatory response and it was occur in teeth from young and old patients.

Acknowledgements

This study was performed by Douglas Augusto Roderjan as partial fulfillment of his PhD's degree at the University Estadual de Ponta Grossa (UEPG), Ponta Grossa, PR, Brazil. The authors would like to thanks FGM Dental Products for the generous donation of all products used in this study. This study was partially supported by

National Council for Scientific and Technological Development under grants 301937/2009-5; 301891/2010-9; and 301291/2010-1.

Referências

1. Haywood VB, Heymann HO. Nightguard vital bleaching. *Quintessence Int.* 1989 Mar;20(3):173-6.
2. Barghi N. Making a clinical decision for vital tooth bleaching: at-home or in-office? *Compend Contin Educ Dent.* 1998 Aug;19(8):831-8; quiz 840.
3. Giachetti L, Bertini F, Bambi C, Nieri M, Scaminaci Russo D. A randomized clinical trial comparing at-home and in-office tooth whitening techniques: A nine-month follow-up. *J Am Dent Assoc.* 2010 Nov;141(11):1357-64
4. Tay LY, Kose C, Herrera DR, Reis A, Loguercio AD. Long-term efficacy of in-office and at-home bleaching: a 2-year double-blind randomized clinical trial. *Am J Dent.* 2012 Aug;25(4):199-204.
5. Marson FC, Sensi LG, Vieira LC, Araújo E. Clinical evaluation of in-office dental bleaching treatments with and without the use of light-activation sources. *Oper Dent* 2008 Jan-Feb;33:15-24.
6. Kossatz S, Dalanhol AP, Cunha T, Loguercio A, Reis A. Effect of light activation on tooth sensitivity after in-office bleaching. *Oper Dent.* 2011 May-Jun;36(3):251-7.
7. Reis A, Dalanhol AP, Cunha TS, Kossatz S, Loguercio AD. Assessment of tooth sensitivity using a desensitizer before light-activated bleaching. *Oper Dent.* 2011 Jan-Feb;36(1):12-7.
8. Almeida LC, Riehl H, Santos PH, Sundfeld ML, Briso AL. Clinical evaluation of the effectiveness of different bleaching therapies in vital teeth. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 2012 Jun;32(3):303-9.
9. Jorgensen MG, Carroll WB. Incidence of tooth sensitivity after home whitening treatment. *J Am Dent Assoc.* 2002 Aug;133(8):1076-82.
10. Leonard RH Jr, Smith LR, Garland GE, Tiwana KK, Zaidel LA, Pugh G Jr, Lin NC. Evaluation of side effects and patients' perceptions during tooth bleaching. *J Esthet Restor Dent.* 2007;19(6):355-64.
11. Costa CAS, 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:e59-64.
12. Morse DR. Age-related changes of the dental pulp complex and their relationship to systemic aging. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1991 Dec;72(6):721-45
13. Murray PE, Stanley HR, Matthews JB, Sloan AJ, Smith AJ. Age-related odontometric changes of human teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2002;93:474-82.

14. Pashley DH. Dentin-predentin complex and its permeability: physiologic overview. *J Dent Res.* 1985 Apr;64 Spec No:613-20
15. Mjör IA. Dentin permeability: the basis for understanding pulp reactions and adhesive technology. *Braz Dent J.* 2009;20(1):3-16.
16. de Souza Costa CA, Hebling J, Randall RC. Human pulp response to resin cements used to bond inlay restorations. *Dent Mater* 2006;22:954-62.
17. Costa CAS, Teixeira HM, Nascimento ABL, Hebling J. Biocompatibility of resin-based dental materials applied as liners in deep cavities prepared in human teeth. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2007;81:175-84.
18. Costa CAS, Nascimento ABL, Teixeira HM, Fontana UF. Response of human pulps capped with a self-etching adhesive system. *Dent Mater* 2001;17:230-40.
19. Accorinte MLR, Reis A, Dourado Loguercio A, Cavalcanti de Araújo V, Muench A. Influence of rubber dam isolation on human pulp responses after capping with calcium hydroxide and an adhesive system. *Quintessence Int* 2006;37:205-12.
20. Gottardi MS, Brackett MG, Haywood VB. Number of in-office light-activated bleaching treatments needed to achieve patient satisfaction. *Quintessence International* 2006; 37:115-20.
21. Cooper JS, Bokmeyer TJ, Bowles WH. Penetration of the pulp chamber by carbamide peroxide bleaching agents. *Journal of Endodontics* 1992;18:315-17.
22. Hanks CT, Fat JC, Wataha JC, Corcoran JF. Cytotoxicity and dentin permeability of carbamide peroxide and hydrogen peroxide vital bleaching materials, *in vitro*. *Journal of Dental Research* 1993;72:931-8.
23. Benetti AR, Valera MC, Mancini MNG, Miranda CB, Balducci. *In vitro* penetration of bleaching agents into the pulp chamber. *International Endodontic Journal* 2004;37: 120-4.
24. Sulieman M, Addy M, MacDonald E, Rees JS. The effect of hydrogen peroxide concentration on the outcome of tooth whitening: an *in vitro* study. *Journal of Dentistry* 2004;32:295-9.
25. Gökyay O, Müjdecı A, Algin E. *In vitro* peroxide penetration into the pulp chamber from newer bleaching products. *International Endodontic Journal* 2005;38:516-20.
26. Kawamoto K, Tsujimoto Y. Effects of the hydroxyl radical and hydrogen peroxide on tooth bleaching. *Journal of Endodontics* 2004;30:45-50.
27. Markowitz K. Pretty painful: why does tooth bleaching hurt? *Medical Hypotheses* 2010;74:835-40.

28. Dias Ribeiro AP, Sacono NT, et al. Cytotoxic effect of a 35% hydrogen peroxide bleaching gel on odontoblast-like MDPC-23 cells. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology & Endodontics* 2009;108:458-64.
29. Trindade FZ, Ribeiro AP, Sacono NT, et al. Trans-enamel and trans-dentinal cytotoxic effects of a 35% H₂O₂ bleaching gel on cultured odontoblast cell lines after consecutive applications. *International Endodontic Journal* 2009;42:516-24.
30. Solheim T. Amount of secondary dentin as an indicator of age. *Scand J Dent Res* 1992;100:193-9.
31. Cox CF, White KC, Ramus DL, Farmer JB, Snuggs HM. Reparative dentin: factors affecting its deposition. *Quintessence Int* 1992;23(4):257-70.
32. Robertson A, Lundgren T, Andreasen JO, Dietz W, Hoyer I, Noren JG. Pulp calcifications in traumatized primary incisors: a morphological and inductive analysis study. *Eur J Oral Sci* 1997;105(3):196-206.
33. Stanley HR, Pereira JC, Spiegel E, Broom C, Schultz M. The detection and prevalence of reactive and physiologic sclerotic dentin, reparative dentin and dead tracts beneath various types of dental lesions according to tooth surface and age. *J Oral Pathol* 1983;12(4):257-89.
34. Lesot H, Smith AJ, Tziafas D, Begue- Kirn C, Cassidy N, Ruch JV. Biologically active molecules and dental tissue repair: a comparative view of reactionary and reparative dentinogenesis with the induction of odontoblast differentiation in vitro. *Cells Materials* 1994;4:199-218.
35. Murray PE, About I, Lumley PJ, Smith G, Remusat R, Franquin J-C, et al. Postoperative pulpal and repair responses. *J Am Dent Assoc* 2000;131:321-9.
36. About I, Murray PE, Franquin J-C, Remusat R, Smith AJ. The effect of cavity restoration variables on odontoblast cell numbers and dental repair. *J Dent* 2001;29:109-17.
37. Bowles WH, Burns H Jr. Catalase/peroxidase activity in dental pulp. *Journal of Endodontics* 1992;18: 527-34.
38. Anderson DG, Chiego DJ Jr, Glickman GN, McCauley LK. A clinical assessment of the effects of 10% carbamide peroxide gel on human pulp tissue. *Journal of Endodontics* 1999;25:247-50.

Table 1 – Product composition, technique (code) and application regime.

Product composition	Application mode
35% hydrogen peroxide, thickeners, dye mixture, glycol, inorganic load and deionized water	For the bleaching of each tooth, three drops of phase 1 (hydrogen peroxide) were mixed with one drop of phase 2 (thickener). A thin layer of gel, approximately 0.5 mm thick, was applied on the buccal surface of all teeth undergoing treatment. The bleaching gel were left on the teeth surface for 15 min and then removed with an aspirator. This procedure was repeated 3 times.

Table 2 - Scores used during the histological examination: inflammatory cell response, tissue disorganization and reactionary dentin formation.

Score	INFLAMMATORY CELL RESPONSE
	Characterization
0	None or a few scattered inflammatory cells present in the pulp area corresponding to the buccal surface of the tooth in which the bleaching gel was applied
1	Mild inflammatory cell infiltrate with polymorphonuclear or mononuclear leukocytes
2	Moderate inflammatory cell infiltrate
3	Severe inflammatory cell infiltrate
Score	TISSUE DISORGANIZATION
	Characterization
0	Normal pulp tissue
1	Pulp zones (odontoblast, acellular, and cell-rich) disorganization in the buccal surface of the tooth in which the bleaching gel was applied
2	Coronary pulp tissue disorganization with partial local necrosis
3	Intense pulp disorganization with necrosis in the coronay and root pulp tissue
Score	TERTIARY DENTIN FORMATION
	Characterization
0	Absence
1	Modest hard tissue deposition in coronary pulp of the tooth in which the bleaching gel was applied
2	Moderate hard tissue deposition in the coronay pulp tissue of the tooth in which the bleaching gel was applied
3	Intense hard tissue deposition in the coronay and root pulp tissue

Table 3 – Means \pm standard deviations (SD) and medians of shade guide units and Δ SGU for the experimental groups as well as the number of patients with tooth sensitivity (TS) for each group.

Groups	Shade guide unit				Δ SGU (*)	Sensitivity	
	Before		After				
	Mean \pm SD	Median (interquartile range)	Mean \pm SD	Median (interquartile ranges)			
Control YT	5.0 \pm 0.0	5 (5/5)	5.0 \pm 0.0	5 (5/5)	0.0 \pm 0.0	0 (0/0) A	0/4 a
Bleached YT	5.5 \pm 1.4	5 (5/5)	2.4 \pm 1.2	2 (2/5)	3.1 \pm 1.2	1.0 (0/3) A,B	5/5 b
Control OT	5.0 \pm 0.0	5 (5/5)	5.0 \pm 0.0	5 (5/5)	0.0 \pm 0.0	0 (0/0) A	0/4 a
Bleached OT	5.7 \pm 1.6	5 (5/5)	3.5 \pm 1.3	3 (2/5)	2.2 \pm 1.1	3 (3/3)B	3/5 a,b

(*) Similar upper case letters indicate statistically similar groups for Δ SGU (Mann-Whitney test, $p < 0.05$). (**) Similar lower case letters indicate statistically similar groups for tooth sensitivity (TS) (Fisher exact, test $p < 0.05$).

Table 4 – Mean and standard deviation of dentin thickness (μm) for each experimental group.

Experimental groups	Dentin thickness (μm)*	Main factor age (μm)
Control YT	1.77 \pm 0.07 b	1.77 \pm 0.08
Bleached YT	1.76 \pm 0.08 b	
Control OT	1.98 \pm 0.11 a	1.99 \pm 0.10
Bleached OT	1.99 \pm 0.09 a	

(*) Different letters mean significant differences (ANOVA test, $p < 0.05$).

Table 5 - Number of specimens for each group in each criterion as well as multiple comparisons among the experimental conditions.

Groups	Criteria															Overall Median (*)	
	Inflammatory cell response					Tissue disorganization					Tertiary dentin formation						
	0	1	2	3	Median	0	1	2	3	Median	0	1	2	3	Median		
Control YT	4	0	0	0	0	4	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0 a
Bleached YT	0	3	2	0	1	0	1	4	0	2	0	1	3	1	2	1	2 b
Control OT	4	0	0	0	0	4	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0 a
Bleached OT	0	3	2	0	1	0	2	3	0	2	0	2	2	1	2	1	2 b

(*) Overall medians for each group. Different letters mean significant differences (Mann-Whitney test, $p < 0.05$).

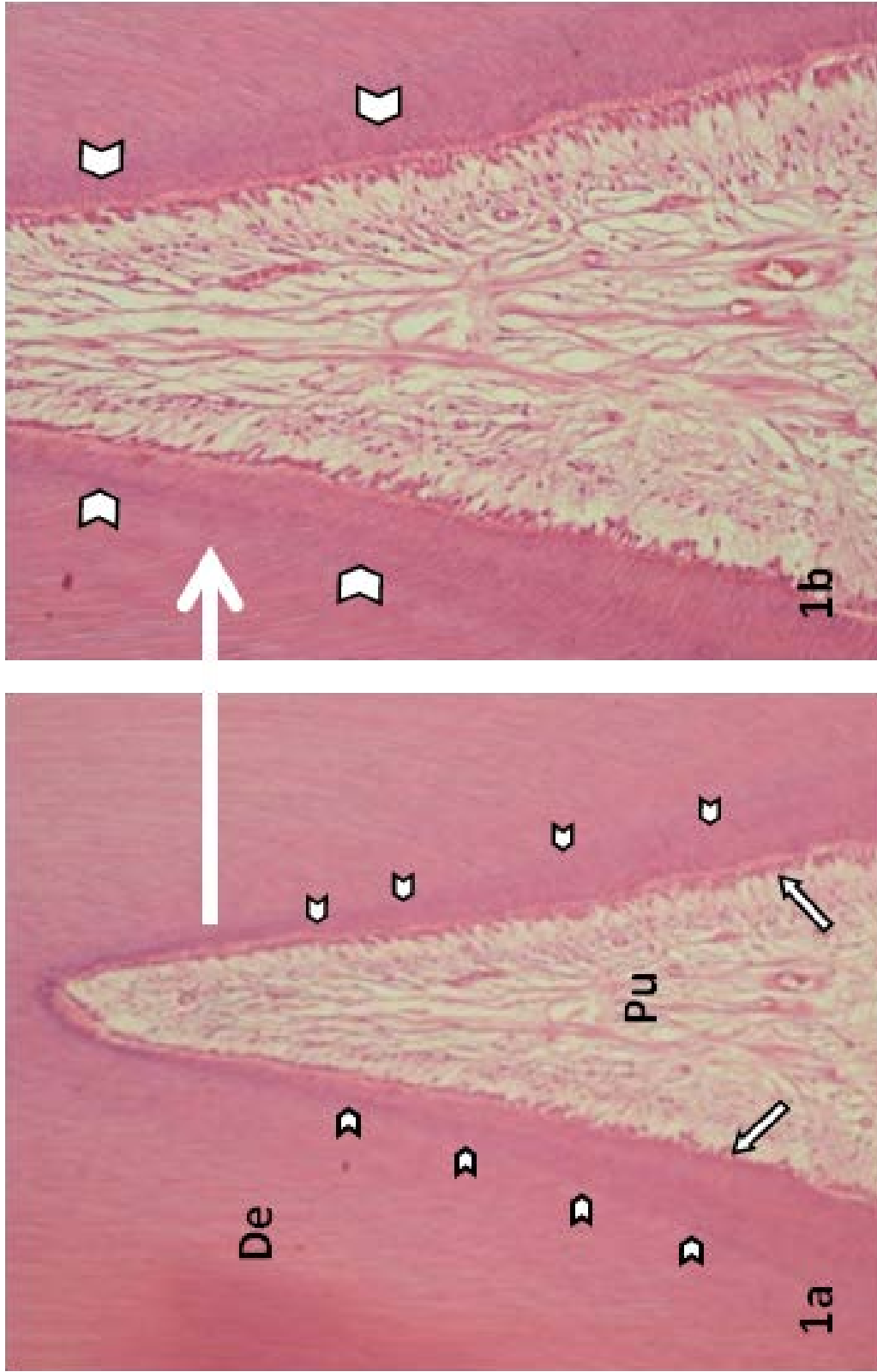


Figure 1: Control OT. A – General view of the pulp-dentin complex. A continuous layer of odontoblasts (arrows) is underlying the predentin. Incremental lines characterizing the secondary physiological dentin deposition can be observed (arrows heads). **B** – Detail of figure 1A. Note the cell-free zone, cell rich zone and the central core of the pulp tissue. Note the incremental lines in dentin (arrows heads). H/E, 125x. (P = Pulp; D = Dentin).

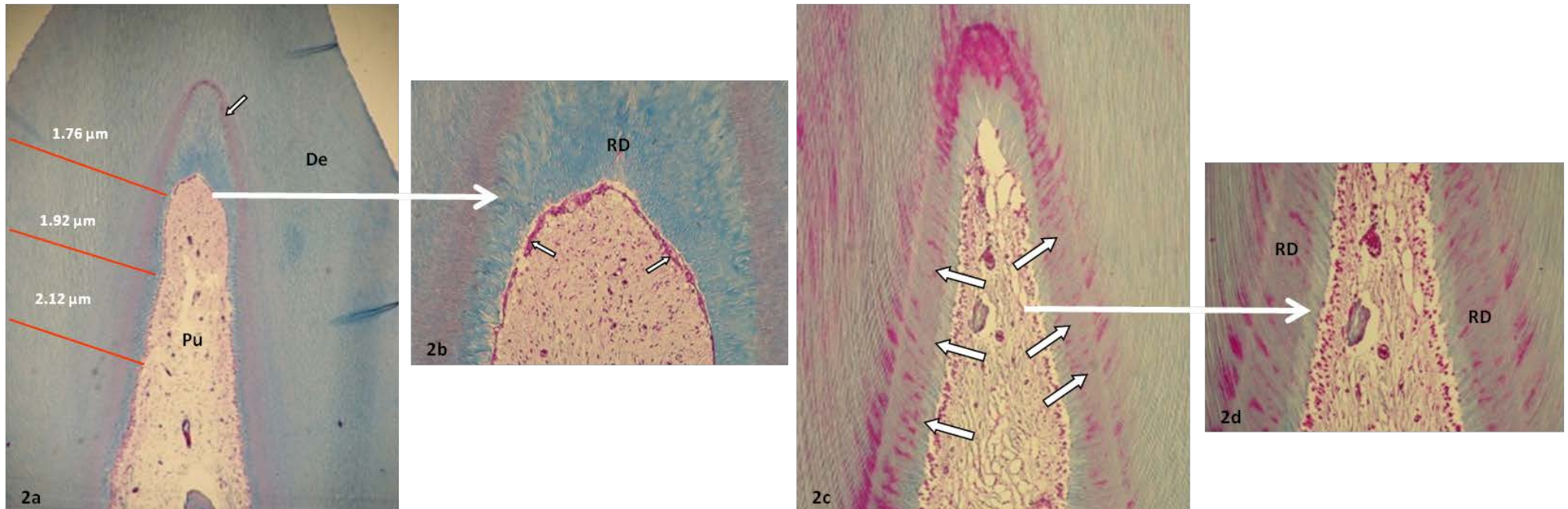


Figure 2: 35% HP - OT. a – Intense deposition of reactionary dentin was observed in the tip of pulp horn (arrow). In an over view, reactionary dentin was also deposited around the coronal pulp tissue. Note that the DT was measured from the EDJ to the calcium-traumatic line (red color). In this specific sample, the DT was 1.92 μm . Masson's Trichrome, 32x. **b** – Detail of the Fig. 2 A. A continuous odontoblast layer (arrows) is underlying the tubular reactionary dentin. Masson's Trichrome, 250x. (P = Pulp; D = Dentin; RD = Reactionary Dentin). This is another example of **35% HP – OT (2c/d)** - **c** – In this sample in which the DT was 2.125 μm , a moderate deposition of reactionary dentin (arrows) was observed around the coronal pulp tissue. Masson's Trichrome, 48x. **d** – Detail of the Fig. 3 A. Note that the reactionary dentin exhibits lower number of tubules than observed in the circumpulpal physiological dentin. Masson's Trichrome, 250x. (RD = Reactionary Dentin).

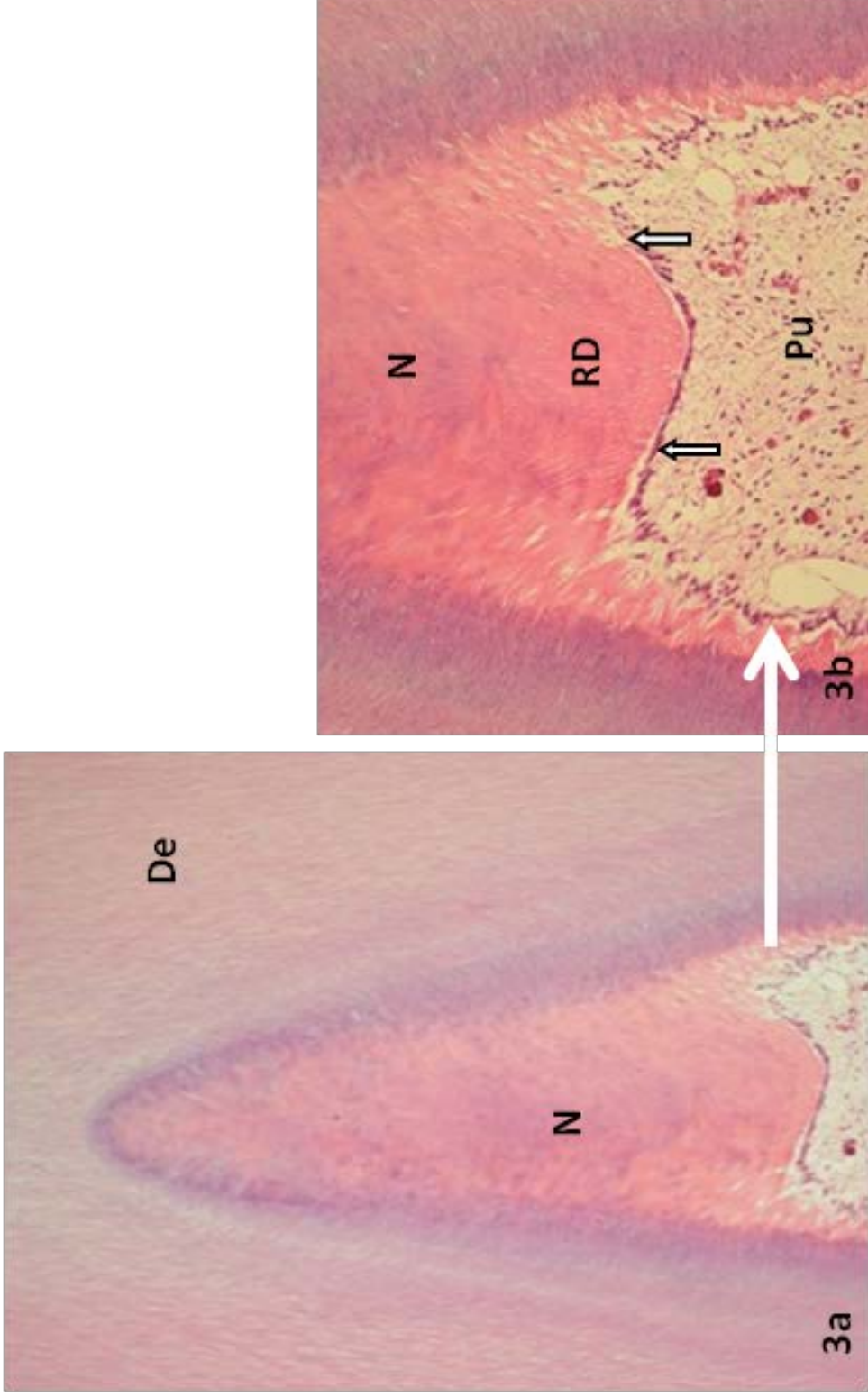


Figure 3: 35% HP - YT. A – Partial coagulation necrosis was observed in the pulp horn (N). Deposition of reactionary dentin was observed below the necrotic tissue as well as around the residual coronal and radicular pulp. H/E, 48x. **B** – Detail of the Fig. 4 A. Note the continuous odontoblast layer (arrows) underlying the tubular reactionary dentin. The subjacent pulp tissue exhibits discrete inflammatory response mediated by mononuclear cells among a number of small congested blood vessels. H/E, 250x. (P = Pulp; D = Dentin; RD = Reactionary Dentin).

6 DISCUSSÃO GERAL

Embora o principal objetivo destes três estudos fosse avaliar as respostas pulpares de incisivos inferiores humanos de diferentes idades a várias concentrações, técnicas de aplicação e produtos a base de PH aplicado no clareamento de consultório, a eficácia e sensibilidade dentária também foram avaliadas como forma de atestar se a técnica de clareamento estava sendo corretamente executada.

Conforme conclusões anteriores de estudos clínicos, a aplicação de PH em menores concentrações, como por exemplo 20%, tal como avaliado no **1º estudo** demonstra menor intensidade de sensibilidade, mas também menores graus de clareamento quando comparado ao PH a 35% (Marson et al., 2008; Kugel et al., 2009; Ontiveros, Pavarina, 2009; Tay et al., 2009; Bernardon et al., 2010; Kossatz et al., 2011; Reis et al., 2011), fato esperado já que a eficácia do clareamento depende da concentração do PH e do número de aplicações (Sulieman et al., 2004), o que significa que o clareamento com géis em concentrações mais baixas de PH, requer maior número de aplicações (Sulieman et al., 2004). Contudo, quando são avaliadas as técnicas de aplicação de PH a 35% (1 x 45 min ou 3 x 15 min) com produtos sem cálcio, como em parte do **2º artigo**, não ocorreu uma diferença significativa, nem no padrão de clareamento, bem como na sensibilidade advinda do clareamento, o que é ligeiramente diferente do observado em estudos clínicos aleatorizados (Matis et al., 2009; Reis et al., 2011). Esta pequena diferença pode ser atribuída em parte ao pequeno número amostral utilizado no presente experimento em comparação aos estudos citados anteriormente, mas

especialmente aos diferentes géis clareadores utilizados (Matis et al., 2009; Reis et al., 2011).

Quando o PH a 35% com cálcio foi avaliado, como na segunda parte do **2º artigo**, os resultados demonstraram um bom padrão de clareamento com diminuição do padrão de sensibilidade, e isto parece ser justificado não apenas pela presença de gluconato de cálcio a 2% que aumenta a dureza superficial do esmalte, semelhante ao que se acredita que ocorra com o gel contendo fosfato de cálcio amorfo (Giniger et al., 2005) ou gluconato de cálcio (Kossatz et al., 2012), mas também pela manutenção do pH ao longo do período de aplicação (Kose et al., 2011).

Nos dois primeiros estudos as técnicas foram avaliadas em incisivos humanos de pacientes jovens e, conforme já demonstrado por Costa et al. (2010), o substrato dentário pode influenciar a resposta pulpar ao clareamento. Sendo assim, no **3º. artigo** foi avaliado a influencia da idade dos pacientes, sendo que foram incluídos pacientes jovens e pacientes idosos. Apesar de ser demonstrado que a espessura de dentina na região vestibular dos dentes dos pacientes idosos era maior, não ocorreu diferença no padrão de clareamento e no nível de sensibilidade entre os dentes avaliados.

Já em relação à resposta pulpar aos diferentes procedimentos de clareamento, em geral todas as concentrações (**1º. artigo**) e técnicas (**2º. artigo**) testadas, tanto em dentes de pacientes jovens, como em dentes de pacientes idosos (**3º. artigo**), demonstraram resultados extremamente danosos, mostrando sítios de necrose pulpar e presença de resposta inflamatória leve mediada por células mononucleares e vasos sanguíneos

congestionados, como já demonstrado em estudo anterior, que avaliou a aplicação do PH a 38% (Costa et al . 2010).

Contrariamente a nossa expectativa, não foi observada diferença significativa quando houve a diminuição da concentração do gel clareador para 20% (**1º. artigo**), indicando, provavelmente que a quantidade de PH que atinge a polpa após aplicação de gel de PH a 20% é suficiente para produzir danos similares aos tecidos pulpare do que gel de PH a 35%, já que efeitos citotóxicos em culturas de células também ocorreram após o uso de concentrações mais baixas de PH (Hanks et al., 1993).

Também não foram observadas diferenças entre os dois modos de aplicação de PH (3 x 15 min ou 1 x 45 min), a despeito da nossa expectativa de que, ao não renovar a quantidade de gel sobre a superfície dos dentes, uma menor quantidade de gel clareador estaria disponível para causar a agressão pulpar (**2º. artigo**).

No caso dos dentes de pacientes idosos (**3º. artigo**), apesar do aumento da quantidade de dentina funcionar como potencial agente protetor as agressões do PH, como esta deposição de dentina é feita as expensas do tecido pulpar também ocorre uma diminuição da capacidade de resposta pulpar (Murray et al., 2002), o que justificaria a semelhança entre as respostas pulpares de pacientes jovens e idosos.

Toda esta agressão pode ser justificada pelo fato de que o PH e os produtos da sua degradação, tais como íons hidroxil (OH⁻), podem atuar como radicais livres causando stress oxidativo nas células pulpare (Kawamoto, Tsujimoto, 2004) causando efeitos deletérios sobre diversos componentes celulares (Sies, 1993; Martindale, Holbrook, 2002), o que pode reduzir a

proliferação de células, resultando em necroses ou apoptoses celulares (Allen, Tresini 2000; Trindade et al., 2009; Dias Ribeiro et al., 2009).

A única técnica que demonstrou um menor grau de agressão foi a que utilizou o gel clareador com cálcio na sua composição (**2º. artigo**), já que, por exemplo, 60% dos dentes clareados com este produto exibiram sinais de necrose pulpar, enquanto que 80% dos dentes clareados com produtos sem cálcio apresentaram necrose pulpar. As características desses sítios de necrose também foram diferentes, enquanto que para aqueles contendo cálcio apenas estreitas zonas superficiais de necrose foram observadas, áreas maiores de necrose envolvendo os cornos pulpares inteiros foram observados naqueles clareados com produtos livre de cálcio, indicando que algumas características do gel contendo cálcio poderiam ter evitado efeitos mais nefastos no tecido pulpar. Infelizmente, os escores utilizados para a categorização dos eventos histopatológicos não foram discriminativos o suficiente para detectar algumas diferenças sutis que possam ser observadas durante a análise histopatológica o que redundou em resultados estatisticamente semelhantes. Entretanto, isto abre uma luz para que, géis que contenham agentes, tais como o testado no presente estudo, possam ser testados no futuro em concentrações menores e por menor tempo de uso.

Vale a pena mencionar que a resposta pulpar dos dentes clareados na presente investigação bem como no estudo de Costa et al. (2010), não está de acordo com achados nas literaturas anteriores, pois estudos *in vivo* demonstraram danos pulpares insignificantes após clareamento em consultório. Por exemplo, Cohen, Chase (1979), aplicaram PH a 35% associado ao calor durante três aplicações de 30 minutos e não mostraram nenhuma evidência

histológica de danos pulpare. Outro estudo relatou somente uma pequena inflamação após duas aplicações de 5 minutos de um produto a base de PH a 35% (Robertson, Melfi, 1980). Mais recentemente, Kina et al. (2010) também não mostraram quaisquer danos pulpare após uso de gel de PH a 38% aplicado em 3 vezes de 10 minutos cada, com aplicação ou não de luz para ativação. A principal diferença entre estes estudos e o presente é o tipo de dente submetido ao procedimento de clareamento. No presente estudo, incisivos inferiores em vez de pré-molares tiveram seu tecido pulpar avaliado após clareamento em consultório.

Haywood (2005) relatou que clareamento induzia sensibilidade dentária, principalmente, nos dentes com menor espessura, como os laterais superiores e os incisivos inferiores. Isto também foi comprovado por Costa et al. (2010), que avaliaram a resposta pulpar histológica de incisivos e pré-molares submetidos a clareamento em consultório. Os autores mostraram necrose do tecido pulpar coronário dos incisivos inferiores, mas não dos pré-molares, quando gel de clareamento com PH a 38% foi avaliado (Costa et al., 2010).

Do ponto de vista clínico, os resultados deste estudo devem ser interpretados com cautela, pois danos causados pelo PH a polpa serem ou não reversíveis, ainda deve ser esclarecido. Além disso, não foram encontrados relatos de caso na literatura indicando a necessidade de endodontia devido aos procedimentos de clareamento em consultório e, portanto, mais estudos avaliando a vitalidade pulpar em longo prazo após clareamento em consultório devem ser realizados. Contudo, enquanto mais estudos não foram feitos para esclarecer estas questões, o clareamento em consultório de dentes incisivos

inferiores deve ser evitado, devendo ser indicado o clareamento caseiro que utiliza concentrações mais baixas de PH.

7 CONCLUSÃO

O primeiro estudo permite concluir que:

O clareamento com géis de PH a 20% ou 35% aplicados durante 45 minutos (3 x 15 min) sobre a superfície do esmalte vestibular de incisivos inferiores humanos causam danos pulparem semelhantes, caracterizados por necrose parcial do tecido pulpar coronário associada à deposição de dentina reacionária e resposta inflamatória leve.

O segundo estudo permite concluir que:

O clareamento com géis de PH a 35%, sem a presença de cálcio, aplicados durante 45 minutos sobre a superfície do esmalte de incisivos inferiores humanos causam danos pulparem intensos semelhantes ao observado no primeiro estudo, independentemente do modo de aplicação. Danos pulparem menos intensos foram produzidos por géis de PH a 35% contendo cálcio, além de causar menor sensibilidade nos dentes comparado aqueles sem a presença de cálcio.

O terceiro estudo permite concluir que:

O clareamento com géis de PH a 35% aplicados durante 45 minutos sobre a superfície do esmalte vestibular de incisivos inferiores humanos causam danos pulparem semelhantes independentemente da idade dos pacientes.

8 REFERÊNCIAS

1. Samorodnitzki-Naveh GR, Geiger SB, Levin L. Patients' satisfaction with dental esthetics. *J Am Dent Assoc* 2007;138:805-8.
2. Tin-Oo, MM, Saddki N, Hassan N. Factors influencing patient satisfaction with dental appearance and treatments they desire to improve aesthetics. *BMC Oral Health* 2011;11:6-13.
3. Haywood VB, Heymann HO. Nightguard vital bleaching. *Quintessence Int* 1989;20:173-6.
4. Barghi N. Making a clinical decision for vital tooth bleaching: At-home or in-office? *Compend Contin Educ Dent* 1998;19:831-8.
5. Perdigão J, Baratieri LN, Arcari GM. Contemporary trends and techniques in tooth whitening: A review. *Pract Proced Aesthet Dent* 2004;16:185-92.
6. Clinical Research Associates. Vital tooth bleaching, in-office. *CRA Newsletter* 2000;24:1-3.
7. Haywood VB. Current status of nightguard vital bleaching. *Compend Contin Educ Dent* 2000;28:S10-17.
8. Leonard RH Jr, Bentley C, Eagle JC, Garland GE, Knight MC & Phillips C. Nightguard vital bleaching: A long-term study on efficacy, shade retention, side effects and patients perceptions. *J Esthet Restor Dent* 2001;13:357-69.
9. Dahl JE, Pallensen U. Tooth bleaching – a critical review of the biological aspects. *Crit Rev Oral Biol Med* 2003;14:292-304.

10. Perdigão J. Dental whitening – revisiting the myths. *Northwest Dent* 2010;89:19-21,23-6.
11. Zekonis R, Matis BA, Cochran MA, Al Shetri SE, Eckert GJ, Carlson TJ. Clinical evaluation of in-office and at-home bleaching treatments. *Oper Dent* 2003;28:114-21.
12. Auschill TM, Hellwig E, Schmidale S, Sculean A, Arweiler NB. Efficacy, side-effects and patients' acceptance of different bleaching techniques (OTC, in-office, at-home). *Oper Dent* 2005;30:156-63.
13. Tay LY, Kose C, Loguercio AD, Reis A. Assessing the effect of a desensitizing agent used before in-office tooth bleaching. *J Am Dent Assoc* 2009;140:1245-51.
14. Bernardon JK, Sartori N, Ballarin A, Perdigão J, Lopes GC, Baratieri LN. Clinical performance of vital bleaching techniques. *Oper Dent* 2010;35:3-10.
15. Salem YM, Osman YI. The effect of in-office vital bleaching and patient perception of the shade change. *SADJ* 2011;66:70, 72-6.
16. Kossatz S, Dalanhol AP, Cunha T, Loguercio A, Reis A. Effect of light activation on tooth sensitivity after in-office bleaching. *Oper Dent* 2011;36:251-7.
17. Reis A, Tay LY, Herrera DR, Kossatz S, Loguercio AD. Clinical effects of prolonged application time of an in-office bleaching gel. *Oper Dent* 2011;36:590-6.
18. Cooper JS, Bokmeyer TJ, Bowles WH. Penetration of the pulp chamber by carbamide peroxide bleaching agents. *J Endod* 1992;18:315-7.

19. 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;72:931-8.
20. Benetti AR, Valera MC, Mancini MNG, Miranda CB, Baldicci I. In vitro penetration of bleaching agents into the pulp chamber. *Int Endod J* 2004;37:120-4.
21. Sulieman M, Addy M, MacDonald E, Rees JS. The effect of hydrogen peroxide concentration on the outcome of tooth whitening: an in vitro study. *J Dent* 2004;32:295-9.
22. Gökay O, Müjdeci A, Algin E. In vitro peroxide penetration into the pulp chamber from newer bleaching products. *Int Endod J* 2005;38:516-20.
23. Costa CAS, 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:e59-64.
24. Al-Qunaian TA, Matis BA, Cochran MA. In vivo kinetics of bleaching gel with three-percent hydrogen peroxide within the first hour. *Oper Dent* 2003;28:236-41.
25. Trindade FZ, Ribeiro AP, Sacono NT, Oliveira CF, Lessa FC, Hebling J, Costa CAS. Trans-enamel and trans-dentinal cytotoxic effects of a 35% H₂O₂ bleaching gel on cultured odontoblast cell lines after consecutive applications. *Int Endod J* 2009;42:516-24.
26. Coldebella CR, Ribeiro AP, Sacono NT, Trindade FZ, Hebling J, Costa CAS. Indirect cytotoxicity of a 35% hydrogen peroxide bleaching gel on cultured odontoblast-like cells. *Braz Dent J* 2009;20:267-74.

27. Dias Ribeiro AP, Sacono NT, Lessa FC, Nogueira I, Coldebella CR, Hebling J, de Souza Costa CAS. 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;108:458-64.
28. Marson FC, Sensi LG, Vieira LC, Araújo E. Clinical evaluation of in-office dental bleaching treatments with and without the use of light-activation sources. *Oper Dent* 2008;33:15-22.
29. Matis BA, Cochran MA, Wang G, Eckert GJ. A clinical evaluation of two in-office bleaching regimens with and without tray bleaching. *Oper Dent* 2009;34:142-9.
30. Kossatz S, Martins GC, Loguercio AD, Reis A. Tooth sensitivity and bleaching effectiveness of a calcium-containing in-office bleaching gel. *J Am Dent Assoc* ,*in press*, 2012.
31. Giniger M, Macdonald J, Ziemba S, Felix H. The clinical performance of professionally dispensed bleaching gel with added amorphous calcium phosphate. *J Am Dent Assoc* 2005;136:383-92.
32. Price RB, Sedarous M, Hiltz GS. The pH of tooth-whitening products *J Can Dent Assoc* 2000;66:421-6.
33. Freire A, Archegas LR, de Souza EM, Vieira S. Effect of storage temperature on pH of in-office and at-home dental bleaching agents. *Acta Odontol Latinoam* 2009;22:27-31.
34. He LB, Shao MY, Tan K, Xu X, Li JY. The effects of light on bleaching and tooth sensitivity during in-office vital bleaching: A systematic review and meta-analysis. *J Dent* 2012;[*Epub a head of print*].

35. Costa CAS, Nascimento ABL, Teixeira HM, Fontana UF. Response of human pulps capped with a self-etching adhesive system. *Dent Mater* 2001;17:230-40.
36. Accorinte MLR, Reis A, Dourado Loguercio A, Cavalcanti de Araújo V, Muench A. Influence of rubber dam isolation on human pulp responses after capping with calcium hydroxide and an adhesive system. *Quintessence Int* 2006;37:205-12.
37. Costa CAS, Teixeira HM, Nascimento ABL, Hebling J. Biocompatibility of resin-based materials applied as liners in deep cavities prepared in human teeth. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2007;81:175-84.
38. Accorinte ML, Loguercio AD, Reis A, Costa CAS. Response of human pulps capped with different self-etch adhesive systems. *Clin Oral Investig* 2008;12:119-27.
39. Costa CAS, Hebling J, Randall RC. Human pulp response to resin cements used to bond inlay restorations. *Dent Mater* 2006;22:954-62.
40. Kugel G, Ferreira S, Sharma S, Barker ML, Gerlach RW. Clinical trial assessing light enhancement of in-office tooth whitening. *J Esthet Restor Dent* 2009;21:336-47.
41. Ontiveros JC, Paravina RD. Color change of vital teeth exposed to bleaching performed with and without supplementary light. *J Dent* 2009;37:840-7.
42. Kose C, Arana LA, Rivera MI, Gomes OMM, Reis A, Loguercio AD. Avaliação in vitro das alterações no pH de agentes clareadores em função do tempo. *Braz Oral Res* 2011;25(suppl.1):341.

43. Murray PE, Stanley HR, Matthews JB, Sloan AJ, Smith AJ. Age-related odontometric changes of human teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2002;93:474–82.
44. Kawamoto K, Tsujimoto Y. Effects of the hydroxyl radical and hydrogen peroxide on tooth bleaching. *J Endod* 2004;30:45-50.
45. Sies H. Strategies of antioxidant defense. *Eur J Biochem* 1993; 215(2):213-9.
46. Martindale JL, Holbrook NJ. Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival. *J Cell Physiol* 2002;192:1-15.
47. Allen RG, Tresini M. Oxidative stress and gene regulation. *Free Radic Biol Med* 2000; 28:463-99.
48. Cohen SC, Chase C. Human pulpal response to bleaching procedures on vital teeth. *J Endod* 1979;5:134-8.
49. Robertson WD, Melfi RC. Pulpal response to vital bleaching procedures. *J Endod* 1980;6:645-49.
50. Kina JF, Huck C, Riehl H, Martinez TC, Sacono NT, Ribeiro AP, Costa CAS. Response of human pulps after professionally applied vital tooth bleaching. *Int Endod J* 2010;43:572-80.
51. Haywood VB. Treating sensitivity during tooth whitening. *Compend Contin Educ Dent* 2005; 26:11-20.
52. Mjör IA. Dentin permeability: the basis for understanding pulp reactions and adhesive technology. *Braz Dent J* 2009;20:3-16.

9 ANEXOS

ANEXO 1

**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA PARA ESTUDOS EM SERES
HUMANOS (COEP)**



PARECER N° 76/2010
Protocolo: 09171/10

Em reunião ordinária, realizada dia 26 de Agosto de 2010, a Comissão de Ética em Pesquisa, **APROVOU** o protocolo de pesquisa intitulado "**Avaliação In vivo de Alterações Histológicas Pulpares em Dentes Humanos submetidos a Agentes Clareadores**" de responsabilidade do pesquisador Alessandro Dourado Loguercio.

Conforme Resolução CNS 196/96, solicitamos que sejam apresentados a esta Comissão, relatórios sobre andamento da pesquisa, conforme modelo (<http://www.uepg.br/coep/>).

Data para entrega do relatório Final: Setembro de 2011

Ponta Grossa, 27 de Agosto de 2010.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP



Prof. Dr. Ulisses Coelho

Coordenador

ANEXO 2

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

AVALIAÇÃO *In Vivo* DE ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS PULPARES EM DENTES HUMANOS SUBMETIDOS A AGENTES CLAREADORES

Universidade Estadual de Ponta Grossa – UEPG- PR .Doutorado em Odontologia – Área de Concentração Dentística Restauradora

Você está sendo convidado(a) a participar deste Projeto de Pesquisa que tem a aprovação da UEPG. As informações abaixo têm por objetivo lhe dar condições para que tome a decisão de participar ou não deste estudo conscientemente. Você poderá receber resposta a qualquer pergunta e esclarecimento a qualquer dúvida acerca de assuntos relacionados com esta pesquisa, além de que não haverá custo algum em sua participação, assim como nenhuma forma de pagamento ou premiação pela mesma.

1. O objetivo deste estudo é o de avaliar *in vivo* a resposta histológica (se ocorre inflamação ou não) em polpas dentárias (nervo dentário) de dentes humanos submetidos a tratamento de clareamento dentário com peróxido de hidrogênio (água oxigenada) 35% e 20%, lembrando que este material é liberado para uso em Odontologia.
2. O tempo que será utilizado na primeira consulta será de aproximadamente 60 minutos (1 hora) e nesta será realizado o clareamento dental com peróxido de hidrogênio 35% ou 20% e serão tomadas todas as medidas de proteção que o tratamento exige, tais como, barreira dental (para evitar que o produto entre em contato com a gengiva)
3. Após 2 (dois) dias uma nova consulta será marcada, onde será então extraído(s) aquele(s) dente(s) que recebeu(ram) o clareamento dental, lembrando que após a extração será realizado sutura (dado pontos) e que estes deverão ser removidos por nós após uma (1) semana. Ao final da intervenção, será dado informações de como deve agir após a(s) extração(ões), assim como, será fornecido 4(quatro) comprimidos de paracetamol 750 mg para ser tomado de 6 em 6 horas caso haja necessidade (dor) e se não houver necessidade estes deverão ser devolvidos na consulta onde será retirado os pontos.
4. Você será diretamente beneficiado(a) por participar deste estudo pelo fato de ter seu(s) dente(s) que deve(rão) ser extraído(s), o ser(em) de uma maneira consciente e realizadas com técnica apurada e responsável.
5. Todas as anotações relativas ao seu(s) dente(s) e a sua pessoa serão mantidas confidenciais. Você não será identificado(a) em nenhum relatório ou publicação.
6. Se houver alguma complicação pós-operatório decorrente da(s) extração(ões), tais como hemorragias, alveolite ou alguma outra, estas serão devidamente solucionadas, pelos pesquisadores, sem nenhum custo.
7. Você pode sair deste Projeto de Pesquisa a qualquer hora. A possível sua saída não afetará sua oportunidade de obter tratamento nos dispensários de Odontologia da UEPG ou qualquer outro benefício que você possa receber.
8. Questões relativas ao Projeto e a sua participação poderão ser esclarecidas pelos Pesquisadores Prof. Dr. Alessandro Dourado Loguercio ou pelo cirurgião-dentista Douglas Augusto Roderjan, pelos fones 0xx42-9902-9903 ou 0xx42-9127-8023 respectivamente.
9. Este Projeto tem sua aprovação pelo Comitê de Ética em pesquisa da UEPG. Se você tiver qualquer dúvida, poderá contatar este Comitê pelo fone 0xx42-3220-3108 de segunda a sexta no período das 13:30 hs às 17:30 hs ou pelo email: seccoep@uepg.br

Tendo lido e sendo esclarecido esta declaração, Eu
residente a Rua nº na Cidade de
como nº do RG Concordo em participar desta Pesquisa Clínica

Assinatura do paciente ou responsável / /

Assinatura do pesquisador / /

ANEXO 3

RECOMENDAÇÕES DO FABRICANTE DO WHITENESS HP MAXX

ANEXO 4

DECLARAÇÃO DA UNESP

UNESP  UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

CÂMPUS DE ARARAQUARA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

Araraquara, 22 de Agosto de 2010.

Ao Presidente do COEP

Universidade Estadual de Ponta Grossa

Declaro, a quem possa interessar que, o processamento histológico de todos os dentes da Tese de Doutorado do Prof. Ms. Douglas Augusto Roderjan intitulada: “**AVALIAÇÃO *In Vivo* DE ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS PULPARES EM DENTES HUMANOS SUBMETIDOS A AGENTES CLAREADORES**” e orientada pelo Prof. Dr. Alessandro D. Loguercio serão processadas nos Laboratórios do Departamento de Fisiologia e Patologia da UNESP, Araraquara/SP

Atentamente,

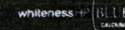


Prof. Dr. Carlos Alberto de Souza Costa
Universidade Estadual Paulista / UNESP
Faculdade de Odontologia de Araraquara
Departamento de Fisiologia e Patologia
Rua Humaitá, 1680 – CEP: 14.801-903
CP: 331 / Araraquara SP Brasil
E-mail: casouzac@foar.unesp.br
Phone: +55(16) 3301 6477
FAX: +55(16) 3301 6488

Rua Humaitá, 1680 - C.P. 331 - Araraquara-SP - CEP 14.801-903
Fone: (016) 201-6334 - FAX (016) 201-6329

ANEXO 5

RECOMENDAÇÕES DO FABRICANTE DO WHITENESS HP BLUE



Cloreador dental para dentes vitais
Somente Uso Profissional

Leia com atenção todas as informações desta bula antes de utilizar o produto. Guarde-a para consulta, no mínimo, até total consumo do produto e não haver mais interação do produto com seu último paciente.

Descrição do Produto

Whiteness HP Blue é um produto que reúne a tecnologia dos melhores clareadores dentais e as novas tendências da odontologia mundial em termos de técnicas conservadoras e seguras para clareamento em consultório. Trata-se de um clareador à base de Peróxido de Hidrogênio a 20% e 35%. Sua formulação é baseada no seu precursor, o clareador Whiteness HP Maxx, com mudança no seu protocolo de utilização e alguns diferenciais de composição que o tornaram mais eficaz mesmo com menor concentração de peróxido. O produto Whiteness HP Blue possui, além da formulação básica do clareador Whiteness HP Maxx, Cálcio para minimizar a redução da microdureza do esmalte decorrente do clareamento, uma nova composição alvadora para potencializar seu desempenho e um novo corante azul que não altera sua cor ao longo do processo e facilita o controle visual de sua aplicação. Com relação ao seu protocolo de utilização, o produto não necessita de aceleração externa com fontes de luz (fotopolimerizador, laser, lâmpadas de plasma, etc.) e a aplicação do gel é única ao longo da sessão (40 minutos na concentração de 35% e 50 minutos na concentração de 20%). O produto conta também com uma nova apresentação, com a qual é possível preparar uma dose de gel suficiente para as duas arcadas dentais e sua aplicação é feita diretamente a partir de uma seringa. Por questões de estabilidade e potencial catalítico, o produto continua mantendo a fase Espessante separada da fase Peróxido e estas são misturadas somente no momento do uso. Para proporcionar mais segurança ao processo e ao usuário, acompanha o Kit uma solução para neutralizar o Peróxido de Hidrogênio em caso de contato acidental com tecidos moles. Trata-se de uma solução contendo 1,25% de enzima Catalase estabilizada em uma composição solvente especial. Esta solução é atóxica e decompõe o peróxido de Hidrogênio muito rapidamente, eliminando sua ação sobre os tecidos moles. Sua ação, entretanto, se restringe à neutralizar o peróxido e evitar a continuidade de sua ação. De danos causados pelo peróxido não conseguem ser revertidos por esta solução.

Indicação do Produto

Da mesma forma que o seu antecessor, Whiteness HP Blue deve ser utilizado exclusivamente em consultório, por profissionais habilitados, sempre com a utilização de um eficiente isolamento para a proteção dos tecidos intra-orais.

O produto é indicado nos seguintes casos:

- Dentes Vitais naturalmente escuros ou amarelados
- Dentes Vitais escurecidos pela idade
- Dentes Vitais que se apresentam escurecidos ou manchados por substâncias estranhas como pigmentos de café, tabaco, etc.
- Em casos mais desafiadores (escurecimento severo) pode ser utilizado em combinação com a técnica caseira.
- A versão HP Blue 20% é mais indicada para clareamento de dentes jovens e com manchamentos das áreas técnicas labiais. Esta versão também segue uma tendência de busca por maior segurança no clareamento de dentes vitais em consultório. Por ser de concentração mais baixa, apresenta menor índice de sensibilidade sendo, portanto, a melhor opção para dentes mais sensíveis.
- A versão HP Blue 35% é indicada para os casos de manchamento mais intensos em dentes mais mineralizados, como é o caso em pessoas de mais idade.

Nota: é importante observar que a literatura mundial demonstra que o clareamento de consultório pode apresentar menor intensidade de clareamento e eventual menor estabilidade de cor (manutenção da cor ao longo do tempo) que a técnica caseira, pois o tempo de contato do clareador com a estrutura dental é maior e mais frequente. Dados da literatura informam que a técnica combinada oferece resultados bastante satisfatórios em seu tratamento de casos resistentes. Por esta razão, é necessário que haja uma interação profissional-paciente no tocante à esclarecimentos sobre resultados, com embasamento em fotos clínicas e escala de cores. É importante, ainda, que o profissional esclareça ao paciente que seus dentes possuem um grau de saturação, sendo que em muitos casos o paciente terá seus dentes clareados embora não ao nível idealizado por este mesmo.

Em relação à hipersensibilidade, deve-se notar que o clareamento em consultório, por apresentar maior concentração de peróxido, pode apresentar maior hipersensibilidade dental durante e/ou após o procedimento do que peróxidos de menor concentração como os de uso caseiro.

Composição Básica

Ingredientes ativos: Peróxido de Hidrogênio a 20% ou 35% (após mistura das fases)
Ingredientes inativos: Espessantes, Pigmento inerte Azul (HP Blue 20%) ou Pigmento inerte Violeta (HP Blue 35%), agentes neutralizantes, Guaiacolato de Cálcio, Glicol e água Deionizada.

Formas de apresentação

Whiteness HP Blue - Kit (6 aplicações):
06 conjuntos de seringas (1,2g por conjunto, 1,2g de gel no total)
01 frasco com 2g de Neutralizante
01 seringa de top dam com 2g e 6 ponteiros (Reg. ANVISA 80172310023)
06 dispositivos de acoplamento das seringas (Reg. ANVISA 80172310023)
06 ponteiros para aplicação do gel

Whiteness HP Blue - Mini Kit (2 aplicações):
02 Conjuntos de seringas (1,2g por conjunto, 2,4g de gel no total)
01 seringa de top dam com 1g e 2 ponteiros (Reg. ANVISA 80172310023)
02 dispositivos de acoplamento das seringas (Reg. ANVISA 80172310023)
02 ponteiros para aplicação do gel

Precauções e Contra-Indicações

- O produto é de uso exclusivo em consultório e deve ser manipulado somente por cirurgiões-dentistas.
- A saúde da cavidade bucal deve ser avaliada previamente ao tratamento. Fissuras no esmalte, infiltrações em eventuais restaurações, dentina exposta e outros fatores que possam comprometer o clareamento devem ser solucionadas antes de se iniciar o tratamento. O produto é contraindicado para pacientes em mau estado de saúde bucal.
- Trincas no esmalte dental são bastante comuns mas geralmente não impedem o clareamento, embora possam ocorrer casos com dores agudas causadas por infiltração demaciada rápida do peróxido na estrutura dental através de trincas. Geralmente este efeito é caracterizado por dor aguda em elementos isolados. Caso o paciente apresente trincas no esmalte mantenha atenção dobrada sobre esta possibilidade, uma vez que não se pode predefinir a profundidade da trinca. Caso ocorra hipersensibilidade de maneira muito intensa, aplique um agente dessensibilizante (Dessensibilize KF 2%) durante 10 minutos. Assim, se esta conduta não for eficaz, considere diminuir o tempo de aplicação do clareador de consultório, complementando com a técnica caseira.
- O produto não é indicado para clareamento de dentes com Amelogenese e dentinogenese imperfeita, fluorese severa, manchamentos intensos por tetraciclina e outras anomalias de esmalte e dentina que coloquem em risco a vitalidade do dente.
- O produto não é indicado para uso sob anestesia do paciente. É importante que se tenha o monitoramento da sensibilidade sentida pelo paciente durante o clareamento. Em casos extremos em que se tenha alguma imperfeição ou falha da estrutura dental de tal forma que o peróxido possa chegar à polpa dental em maior quantidade, pode ocorrer morte pulpar.
- O produto não é indicado para clareamento em gestantes, lactantes e pacientes menores de 15 anos.
- O produto não é recomendado para pessoas que tenham feito recentemente cirurgia de gengiva ou com inflamação do tecido gengival e pessoas com reações alérgicas ao produto.
- Por ser um produto auto catalisado é desnecessário o uso de fontes de luz aceleradoras (sistemas de LED, LASERS de alta potência e outros).
- Condicionalmente ácido do esmalte dental previamente ao clareamento não é necessário e nem recomendado.
- Durante a manipulação do produto, tanto o profissional quanto auxiliar devem usar luvas e óculos de proteção. O paciente deve também utilizar óculos de proteção e outras eventuais proteções necessárias para evitar

contato acidental do produto com a pele e roupas.

Whiteness HP Blue é um clareador com alto poder oxidante e quando em contato com o tecido vivo, pode causar um mancharamento branco e irritação temporária da região afetada (geralmente desaparece em no máximo 2 horas, sem qualquer seqüela).

Em caso de contato acidental com a pele ou tecidos vivos intra-orais, neutralize o peróxido cobrindo a região com algumas gotas da solução Neutralizadora e lave-a em seguida.
O clareador é composto por uma fase chamada Peróxido (fase 1) e outra chamada Espessante (fase 2), as quais deverão ser misturadas no momento do uso. Cuidado deve ser tomado ao se manipular a fase peróxido, pois esta contém peróxido de Hidrogênio a 30% (para o HP Blue 20%) e 50% (para o HP Blue 35%).

O conteúdo das seringas com peróxido pode estar sob pressão e/ou pode ser vazado devido a condições adversas de estocagem. Antes de abrir a embalagem proteja suas mãos e olhos (curtindo dentista e auxiliar) e observe se não há líquido vazado em seu interior. Caso constate vazamento solicite a troca do material.

Proceda à manipulação do produto longe do paciente, sobre uma pia ou espaço seguro e sem riscos de contaminar outras pessoas.

Após o uso do produto lave bem as mãos e materiais contaminados com peróxido. Pense em prevenção e segurança quando estiver manipulando o produto.

Faça um eficiente isolamento do tecido gengival utilizando o protetor gengival fotopolimerizável Top Dam ou dique de borracha associado a um afastador labial. Em todos os casos é fundamental que se evite o contato do peróxido com os tecidos intra-orais.

Deve-se recomendar ao paciente que evite a ingestão de alimentos ácidos e/ou fortemente corados por pelo menos 24 horas após o clareamento para evitar sensibilidade e possível comprometimento do clareamento.

Informe o paciente sobre as possibilidades de sucesso e insucesso no clareamento. Previna a possibilidade de frustrar a expectativa do paciente.

Após a mistura das fases, insira a ponteira e verifique se não há resistência para a liberação do gel clareador antes de aplicar nos dentes do paciente. Se houver resistência, troque a ponteira e teste em uma superfície (por exemplo, bloco de mistura).

O produto deve ser utilizado conforme recomendado em seu protocolo. Não deve ser injetado em hipótese alguma.

Efeitos colaterais

Alguns pacientes podem experimentar sensibilidade dental durante ou após o clareamento. Se o paciente apresentar sensibilidade durante o tratamento, interrompa o clareamento e trate os dentes com o dessensibilizante Dessensibilize KF 2%. Se a sensibilidade persistir e não for possível dar continuidade ao clareamento, marque nova sessão com um intervalo mínimo de 7 dias. Avalie se não há alguma anomalia nos dentes que possa ser corrigida para eliminar tal sensibilidade. Há casos em que a sensibilidade aparece somente após o tratamento (1 ou 2 horas após). Nestes casos, se a sensibilidade for alta, recomenda-se prescrever um analgésico e, eventualmente um anti-inflamatório, conforme necessidade de cada caso.

O clareamento pode realçar áreas de hipocalcificação (hipoplasias) pré-existent devido ao diferente comportamento de clareamento (mais intenso) destas áreas. Em alguns casos essas manchas desapareceram devido à desidratação do esmalte após a conclusão do clareamento. O tratamento com fluor decares também pode auxiliar no seu desaparecimento.

Instruções de Uso

Antes de iniciar o tratamento leia com atenção as Advertências, Precauções, Contra-Indicações e possíveis Efeitos Colaterais.

Preparando-se para o clareamento:

1. Paramente-se (dentista e auxiliar) com seu equipamento de segurança (luvas, óculos, gorro, máscara e avental) para manipular o produto.
2. Paramente, também, seu paciente para evitar contato indevido do gel, utilizando gorro, óculos de proteção e um adequado afastador labial (Arcfix - FGM).
3. Retire a tampa da seringa com Espessante e acople o dispositivo de



Clareamento de dentes vitais

1. Monitore o paciente ao longo de todo o clareamento com relação à sensibilidade dental e possíveis efeitos de irritação por contato com peróxido. Caso haja algum destes casos, interrompa o processo e faça uma verificação e (re)isolamento antes de reiniciar o uso de Precauções e Efeitos Colaterais.
2. Caso o paciente demonstre hipersensibilidade, não continue o clareamento, sugere-se interromper o tratamento e verificar se não há alteração na estrutura dental que possa ser causadora da hipersensibilidade (fissuras, exposição de dentina, etc.). Quando a sensibilidade for de difícil controle ou entã, por alguma razão, nova sessão de clareamento não for possível ou não recomendada, pode-se então complementar o clareamento utilizando clareadores de uso caseiro (Whiteness Perfect, por exemplo).
3. Em casos onde as duas sessões de clareamento preconizadas não resultarem em um nível satisfatório de clareamento (casos de manchamentos mais severos), pode-se estender o tratamento por mais duas sessões, desde que o paciente não apresente hipersensibilidade. Neste caso, deve-se respeitar um intervalo de sete dias entre sessões. Para casos ainda mais desafiadores, uma combinação de clareadores (completando o caso) pode ser indicada de acordo com parâmetros estabelecidos pelo profissional.
4. Resultados satisfatórios podem ocorrer já na primeira sessão. No entanto, é recomendado que se faça mais uma sessão para efeitos de manutenção do tratamento (2 sessões por paciente).
5. Da mesma forma que com os dentes mecânicos de clareamento, o registro da cor dos dentes antes do tratamento, o esclarecimento do paciente sobre as reais perspectivas do seu caso (combinação nos casos de manchamento por tetraciclina, coloração acromatada, etc.), aviso sobre possível sensibilidade, necessidade de troca de restaurações, não recomendada. Há casos em que, por características particulares dos dentes (características do esmalte, tipo de pigmentação, etc.) o nível de clareamento desejado pode não ser possível de se obter.
6. Uma vez feita mistura do clareador, este deverá ser consumido na hora e após a manipulação, pode ser descartado para uso em outra sessão na mesma sessão. O gel não pode ser armazenado para uso em outra sessão após a sua manipulação, pois perderá sua eficácia. Caso ocorra sobre o gel durante a sessão, este deverá ser descartado (diluído com água e descartado no lixo, por exemplo).

Conservação e Armazenamento
Produto de uso Profissional.
-Deve ser utilizado somente por profissionais habilitados.
-Não utilize o produto se este estiver fora do prazo de validade.
-Não descartar o produto de acordo com a legislação de resíduos.
-Armazene o produto em temperaturas entre 5 e 25 °C para melhor conservação.
-Não congelar o produto.
-Proteger da incidência da luz solar direta.

Advertências
Não utilize o produto se este estiver fora do prazo de validade. Para o descarte do produto siga a legislação de seu país. Mantenha fora do alcance de crianças.

Fabricado por:
DENTSPLY/LTD
Av. Edgar Nelson Meister, 474
Barro, Distrito Industrial
89219-901 - Joinville - SC -
Fone: (547) 34416100 Fax: (547) 3427377
Autorização de Funcionamento MS.PM.44XYY00026
CNPJ: 08.106.945/0001-06

INDÚSTRIA BRASILEIRA
Registro ANVISA - 80172310040
Responsável Técnico: Friedrich Georg Mittelstadt
CRB: 1310617-SC

Atendimento ao Profissional:
+ 55 (47) 34416100
www.fgm.br
fgm@fgm.br

EX **IMP** **Clintelg**
Av. Resnau Garcia, 11 - 11F
1070234 Lisboa Portugal
Fone + 351 21 3967321

Este material foi fabricado somente para uso dental e deve ser manipulado de acordo com as instruções de uso. O fabricante não se responsabiliza por danos causados por erro de uso ou manipulação incorreta. Ademais de isto, o usuário está obrigado a comprovar, antes de empregar o produto, a sua responsabilidade, se este material é compatível com a utilização pretendida, principalmente quanto esta utilização não está indicada em estas instruções de uso. Descrições de dados do constituinte nenhum tipo de garantia y, por isso, no podem qualquer vínculo.

Rev: 00

ANEXO 6

FICHA CLINICA PERIODONTAL

FICHA CLÍNICA PERIODONTAL

NOME:

IDADE:

SEXO: ()F ()M

ENDEREÇO:

Nº:

CEP:

Fone:

ELEMENTO(S) DENTÁRIO(S) :

ÍNDICE DE SUPURAÇÃO MARGINAL

ELEMENTO DENTÁRIO	42	41	31	32
0				
1				

0 - Ausência de supuração

1 - Presença de supuração

Após pressão digital sobre a gengiva

ÍNDICE DE PLACA

ELEMENTO DENTÁRIO	42	41	31	32
0				
1				

0 - Ausência de placa

1 - Presença de placa.

SANGRAMENTO A SONDA GEM

ELEMENTO DENTÁRIO	42	41	31	32
0				
1				

0 - Ausência de sangramento

1 - Presença de sangramento

PROFUNDIDADE CLÍNICA A SONDA GEM

ELEMENTO DENTÁRIO	42	41	31	32
0				
1				

0 - bolsas periodontais menores que 7 mm

1 - bolsas periodontais maiores que 7 mm

PERDA CLÍNICA DA INSERÇÃO

ELEMENTO DENTÁRIO	42	41	31	32
0				
1				

0 - não

1 - sim

MOBILIDADE

ELEMENTO DENTÁRIO	42	41	31	32
0				
1				

0 - < que 2 mm

1 - > que 2 mm

OBS.: Os parâmetros foram identificados sempre pelo mesmo examinador, utilizando sonda milimetrada periodontal

ANEXO 7

CARTA DE SUBMISSÃO AO CLINICAL ORAL INVESTIGATIONS

FW: CLOI: Submission Confirmation for Effect of concentration of in-office bleaching treatments on human pulp responses

De: **Rodrigo Zuk** (rodrigozuk1@hotmail.com)
Enviada: quarta-feira, 19 de setembro de 2012 17:08:11
Para: loguercio alessandro (aloguercio@hotmail.com)

> From: darlen.basillaje@springer.com
> To: rodrigozuk1@hotmail.com
> Date: Wed, 19 Sep 2012 16:04:50 -0400
> Subject: CLOI: Submission Confirmation for Effect of concentration of in-office bleaching treatments on human pulp responses
>
> Dear Mr. Stanislawczuk,
>
> Your submission entitled "Effect of concentration of in-office bleaching treatments on human pulp responses" has been received by Clinical Oral Investigations
>
> You will be able to check on the progress of your paper by logging on to Editorial Manager as an author. The URL is <http://cloi.edmgr.com/>. Alternatively, please call us at 001-630-468-7784 (outside the US)/(630)-468-7784 (within the US) anytime from Monday to Friday.
>
> Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.
> *Anexo II - Carta de submissão ao Journal of Oral Pathology and Medicine*
> Thank you for submitting your work to our journal.
>
> Kind regards,
>
> Editorial Office
> Clinical Oral Investigations
>

ANEXO 8

**CARTA DE SUBMISSÃO AO JOURNAL OF ORAL PATHOLOGY AND
MEDICINE**

FW: Journal of Oral Pathology and Medicine - Manuscript ID JOPM-11-12-OA-2370

De: **Rodrigo Zuk** (rodrigozuk1@hotmail.com)
Enviada: terça-feira, 6 de novembro de 2012 00:11:03
Para: loguercio alessandro (aloguercio@hotmail.com)

> Date: Mon, 5 Nov 2012 21:07:57 -0500
> From: ame@dadlnet.dk
> To: rodrigozuk1@hotmail.com
> Subject: Journal of Oral Pathology and Medicine - Manuscript ID JOPM-11-12-OA-2370
>
> 05-Nov-2012
>
> Dear Mr. Rodrigo Stanislawczuk,
>
> Your manuscript entitled "Human pulp response to different in-office bleaching techniques" has been successfully submitted online and is presently being given full consideration for publication in the Journal of Oral Pathology and Medicine. Should your manuscript not comply with the Journal's requirements, however, the Journal's administrator will notify you via email that you need to make specific changes to your manuscript before it can be considered for publication in the Journal of Oral Pathology and Medicine.
>
> Your manuscript ID is JOPM-11-12-OA-2370.
>
> Please mention the above manuscript ID in all future correspondence or when calling the office for questions. If there are any changes in your street address or e-mail address, please log in to Manuscript Central at <http://mc.manuscriptcentral.com/jopm> and edit your user information as appropriate.
>
> You can also view the status of your manuscript at any time by checking your Author Center after logging in to <http://mc.manuscriptcentral.com/jopm> .
>
> Thank you for submitting your manuscript to the Journal of Oral Pathology and Medicine.
>
> Sincerely,
> Anne-Marie Engel
> Administrator, Journal of Oral Pathology and Medicine