

**Eficácia do clareamento dental de consultório sob diferentes
concentrações e seus efeitos no volume de células
inflamatórias do fluído gengival. Ensaio clínico randomizado
duplo cego.**

São Luís –MA 2016

Izabella Santos Ribeiro

**Eficácia do clareamento dental de consultório sob diferentes
concentrações e seus efeitos no volume de células
inflamatórias do fluído gengival. Ensaio clínico randomizado
duplo cego.**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Odontologia da
Universidade CEUMA para obtenção do
título de Mestre em Odontologia

Área de Concentração: Odontologia
Integrada

Orientador: Prof. Dr. Rudys Rodolfo de
Jesus Tavares

Co-Orientador: Prof. Dr. Matheus Coelho
Bandeira

São Luís –MA 2016

R484e Ribeiro, Izabella Santos.

Eficácia do clareamento dental de consultório sob diferentes concentrações e seus efeitos no volume de células inflamatórias do fluido gengival : ensaio clínico randomizado duplo cego. / Izabella Santos Ribeiro. - São Luís : UNICEUMA, 2016.

72 p.:il.

Dissertação (Mestrado) – Curso de Odontologia. Universidade CEUMA, 2016.

1. Clareamento dental. 2. Inflamação gengival. 3. Citocinas. I. Tavares, Rudys Rodolfo de Jesus (Orientador). II. Título.

CDU: 616.314-089.23

Nome: Izabella Santos Ribeiro
Título: Eficácia do clareamento dental de consultório sob diferentes concentrações e seus efeitos no volume de células inflamatórias do fluido gengival.
Ensaio clínico randomizado duplo cego.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade CEUMA para obtenção do título de Mestre.

Data da Aprovação: ____/____/____

Banca Examinadora

1. Professor(a) Dr (a) _____
Instituição: _____
Assinatura: _____
2. Professor(a) Dr (a) _____
Instituição: _____
Assinatura: _____
3. Professor(a) Dr (a) _____
Instituição: _____
Assinatura: _____
4. Professor(a) Dr (a) _____
Instituição: _____
Assinatura: _____

Dedicatória

Dedico esse trabalho, assim como o título de “mestre” ao Senhor Jesus que é minha inspiração e fortaleza. Se até aqui cheguei foi porque Tu seguraste em minha mão e me guiaste. Toda honra e toda glória a Ti, somente Ti, Jesus, amém!

Aos Meus Pais que sempre me apoiam, incentivam, e vibram com minhas conquistas.

À meu noivo Fernando pelo apoio e paciência nos momentos de dificuldade.

Ao Prof. Rudys pelos ensinamentos e apoio na construção e desenvolvimento deste sonho: “ser Mestre”.

Às minhas queridas amigas colegas de desenvolvimento do trabalho que foram essenciais e me impulsionaram a chegar até aqui, Suellen e Carol. Sem vocês realmente não teria conseguido, pois sempre que estava desanimando vocês tinham uma palavra de ânimo. Muito obrigada mesmo, o mérito desse trabalho também é de vocês.

Agradecimientos

Agradecimento especial

-À Universidade Ceuma;

-À FAPEMA pelo financiamento da Pesquisa;

-Aos Colegas de Turma pelos momentos vividos;

-Aos Professores pelos conhecimentos transmitidos;

-Aos Pacientes que se disponibilizaram a participar da pesquisa.

RESUMO

Ribeiro IS. Eficácia do clareamento dental de consultório sob diferentes concentrações e seus efeitos no volume de células inflamatórias do fluido gengival. Ensaio clínico randomizado duplo cego. [dissertação]. São Luís. Universidade CEUMA; 2016

RESUMO

Objetivo: Avaliar a eficácia do clareamento e as citocinas encontradas no fluido crevico gengival (FCG) de pacientes submetidos a clareamento em consultório com diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio assim como, a sensibilidade pós-operatória. **Materiais e Métodos:** Foram selecionados 22 voluntários e submetidos a clareamento dental em consultório utilizando duas concentrações de Peróxido de Hidrogênio, a 15% e 35%. A técnica da boca dividida foi utilizada e os materiais foram alocados aleatoriamente através de randomização com envelopes lacrados. Avaliação da efetividade foi realizada através da escala de cor Vita Clássica e espectrofotômetro. O Fluido Crevico Gengival foi analisado em 04 tempos diferentes para as citocinas Interleucina-1 beta, Interleucina- 6, Interleucina- 4, Fator de Necrose tumoral e Interleucina-10 por ensaio imunoenzimático. A avaliação da sensibilidade foi realizada após cada sessão utilizando a escala VAS e NRS após as sessões de clareamento. Os dados foram submetidos à análise estatística e em todos os testes aplicados o nível de significância foi de 5%. Os dados da efetividade foram submetidos aos testes de Mann- Whitney e teste-t de Student. Os da sensibilidade foram submetidos ao teste de McNemar, ANOVA, Mann- Whitney e Kruskal-Wallis, e os dados do fluido gengival foram submetidos ao teste de Wilcoxon pareado. **Resultados:** Os dois métodos de avaliação da efetividade mostraram que houve diferenças significativas entre os grupos avaliados ($p=0,02$). Não foram encontradas diferenças significantes entre as concentrações estudadas nos níveis volumétricos de interleucinas. Houve diferença significativa para Interleucina-1beta

quando as diferentes concentrações foram comparadas 1 mês após a primeira sessão de clareamento ($p= 0,003$).O nível de sensibilidade dos dentes mostrou diferenças significativas entre os grupos ($p>0,001$), sendo o risco absoluto de 90%.**Conclusão:** O FCG não mostrou quantidade de inflamação suficiente para desencadear o aumento das citocinas estudadas, sendo encontrado um aumento das Interleucina-1beta, após 1 mês de clareamento. O agente clareador de maior concentração produziu maior nível de clareamento e sensibilidade.

Palavras-chave: Clareamento Dental, Inflamação gengival, Citocinas.

Abstract

Ribeiro IS. Efficacy of office dental whitening under different concentrations and their effects on the volume of inflammatory cells of the gingival fluid. Double-blind randomized clinical trial. [dissertation]. São Luís. University CEUMA; 2016

ABSTRACT

Objective: To evaluate the efficacy of bleaching and cytokines found in the gingival crevic fluid (GGF) of patients submitted to bleaching in the office with different concentrations of hydrogen peroxide as well as postoperative sensitivity. **Materials and Methods:** Twenty-two volunteers were selected and submitted to dental whitening in the office using two concentrations of Hydrogen Peroxide at 15% and 35%. The split-mouth technique was used and the materials were randomly allocated through randomization with sealed envelopes. Effectiveness evaluation was performed using the Vita Classical color scale and spectrophotometer. Gingival Crevic Fluid was analyzed at 04 different times for the cytokines Interleukin-1 beta, Interleukin-6, Interleukin-4, Tumor Necrosis Factor and Interleukin-10 cytokines by enzyme-linked immunosorbent assay. The sensitivity assessment was performed after each session using the VAS and NRS scale after the bleaching sessions. Data were submitted to statistical analysis and in all the tests applied the level of significance was 5%. The effectiveness data were submitted to the Mann-Whitney test and Student's t-test. Those of the sensitivity were submitted to the McNemar, ANOVA, Mann-Whitney and Kruskal-Wallis test, and the gingival fluid data were submitted to the paired Wilcoxon test. **Results:** The two methods of effectiveness evaluation showed that there were significant differences between the groups evaluated ($p = 0.02$). No significant differences were found between the concentrations studied in volumetric levels of interleukins. There was a significant difference for Interleukin-1beta when different concentrations were compared 1 month after the first bleaching session ($p = 0.003$). The sensitivity level of the teeth

showed significant differences between the groups ($p > 0.001$), with an absolute risk of 90%. **Conclusion:** The FCG did not show enough inflammation to trigger the increase of the cytokines studied, and an increase of Interleukin-1beta was found after 1 month of bleaching. The higher concentration bleaching agent produced a higher level of whitening and sensitivity.

Key words: Dental bleaching, Gingival inflammation, Cytokines.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Fluxograma com os números de pacientes incluídos no ensaio clínico de acordo com o CONSORT.....	34
Figura 2: Avaliação de cor para seleção dos pacientes da amostra do estudo.....	53
Figura 3: Lase Peroxide Lite- 15%.....	55
Figura 4: Lase Peroxide Sensy- 35%.....	55
Figura 5: Profilaxia antes da primeira sessão de clareamento.....	56
Figura 6: Aplicação de barreira gengival e agentes clareadores.....	57
Figura 7: Espectofotômetro Vita EasyshadeAdvance 4.0.....	57
Figura 8: Guia de Silicone.....	58
Figura 9: Escala de cor VitapanClassical.....	59
Figura 10: Tiras de papel absorvente Periopaper....	59
Figura 11: Coleta do Flúido Crevico Gengival.....	60
Figura 12: Leitura do Flúido coletado no Periotron 8000.....	60

LISTA DE SIGLAS E ABREVIÇÕES

PH 15%	Peróxido de Hidrogênio à 15%
PH 35%	Peróxido de Hidrogênio à 35%
FCG	Fluído Crevico Gengival
IL-1beta	Interleucina- 1 beta
IL- 6	Interleucina- 6
IL- 4	Inteleucina- 4
IL- 10	Interleucina- 10
TFN	Fator de Necrose Tumoral
ΔSGU	Varição de cor na Escala de cor Vita Classical
ΔE	Varição de cor no espectrofotômetro (Vita Easyshade)

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Grupos experimentais, agentes clareadores, fabricante/lote, bem como composição.....	28
Tabela 2– Médias e desvios-padrões da idade, bem como a cor inicial dos pacientes participantes do estudo para todos os grupos experimentais.....	33
Tabela 3- Médias e desvios-padrões de Δ SGU obtidos com o Vita Classical e Δ E obtidos por espectrofotômetro (Vita Easyshade) em diferentes períodos, assim como análise estatística (*).....	36
Tabela 4– Comparação do número de pacientes que apresentaram sensibilidade dentária (SD), pelo menos uma vez durante o tratamento em ambos os grupos, risco absoluto e razão do risco (*).....	37
Tabela 5– Intensidade de sensibilidade dentária (média \pm desvio-padrão) nos diferentes pontos de avaliação para ambos os grupos de estudo e comparação estatística (*).	38
Tabela 6- Médias e desvios-padrões de (μ l _{Log}) dos níveis volumétricos de IL-1beta no início (T0), imediatamente após o clareamento (T1), 24 h após o clareamento (T2) e após 1 mês após o clareamento (T3), assim como análise estatísticas (*).....	39
Tabela7– Médias e desvios padrão de (μ l _{Log}) dos níveis de IL-4 e IL-6 no início (T0), imediatamente após o clareamento(T1), 24 h após o clareamento (T2) e após 1 mês após o clareamento (T3),assim como a analise estatística (*).....	40
Tabela 8- Médias e desvios- padrão de (μ l _{Log}) dos níveis de IL-10, e TNF no início (T0), imediatamente após o clareamento (T1), 24 h após o clareamento (T2) e após 1 mês após o clareamento (T3), assim como a análise.....	41

Sumário

SUMÁRIO

Capítulo

1. Resumo.....	22
2. Introdução.....	24
3. Materiais e Métodos.....	26
4. Resultados	32
5. Discussão.....	42
6. Conclusões.....	45
7. Referências Bibliográficas.....	45

Anexos

Anexos.....	51
Apêndice.....	54

Capítulo 1

Eficácia do clareamento dental de consultório sob diferentes concentrações e seus efeitos no volume de células inflamatórias do fluido gengival. Ensaio Clínico Randomizado duplo cego¹

RESUMO

Objetivo: Avaliar a eficácia do clareamento e as citocinas encontradas no fluido crevico gengival (FCG) de pacientes submetidos a clareamento em consultório com diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio assim como, a sensibilidade pós-operatória. **Materiais e Métodos:** Foram selecionados 22 voluntários e submetidos a clareamento dental em consultório utilizando duas concentrações de Peróxido de Hidrogênio, a 15% e 35%. A técnica da boca dividida foi utilizada e os materiais foram alocados aleatoriamente através de randomização com envelopes. Avaliação da efetividade foi realizada através da escala de cor Vita Clássica e espectrofotômetro. O Fluido Crevico Gengival foi analisado em diferentes tempos para as citocinas Interleucina-1beta, Interleucina- 6, Interleucina - 4, Fator de Necrose tumoral e Interleucina-10 por ensaio imunoenzimático. A avaliação da sensibilidade foi realizada após cada sessão utilizando a escala VAS e NRS. Os dados foram submetidos a análise estatística ($p=0,05$). **Resultados:** Os dois métodos de avaliação da efetividade mostraram que houve diferenças significativas entre os grupos avaliados ($p=0,02$). Não foram encontradas diferenças significantes entre as concentrações estudadas nos níveis volumétricos de interleucinas. Houve diferença significativa para Interleucina-1beta quando as diferentes concentrações foram comparadas 1 mês após a primeira sessão de clareamento ($p=0,003$). O nível de sensibilidade dos dentes mostrou diferenças significativas entre os grupos ($p>0,001$), sendo o risco absoluto de 90%. **Conclusão:** O FCG não mostrou quantidade de inflamação

¹ Artigo a ser submetido à revista OperativeDentistry

suficiente para desencadear o aumento das citocinas estudadas, sendo encontrado um aumento das Interleucina-1beta, após 1 mês de clareamento. O agente clareador de maior concentração produziu maior nível de clareamento e sensibilidade.

Palavras-chave: Clareamento Dental, Inflamação gengival, Citocinas.

1. INTRODUÇÃO

A cor dos dentes é de fundamental importância na conformação da estética do sorriso e está entre as principais causas pelas quais os pacientes procuram tratamento odontológico estético. Diferentes métodos são utilizados para a obtenção de dentes mais claros, dentre estes, destaca-se o clareamento dental, por ser um método não invasivo, de baixo custo e que garante excelentes resultados^{1,2, 3, 4}.

O clareamento dental pode ser realizado por inúmeras técnicas, dentre elas a técnica caseira ou de consultório. Na técnica de consultório a aplicação do material é realizada pelo cirurgião dentista, o que permite maior controle do gel clareador, o que evita o contato deste com os tecidos moles, ingestão, redução do tempo de tratamento, e os resultados são visíveis rapidamente^{3,4}.

O peróxido de hidrogênio (PH) é o material mais utilizado no clareamento de consultório e tem concentrações que variam entre 6% e 40%.⁴ O mecanismo de ação dos peróxidos ainda não está completamente desvendado, contudo, acredita-se que a eficácia do clareamento está associada ao efeito oxidante dos radicais livres liberados pela quebra das moléculas dos peróxidos^{1,2,6}.

A eficácia e o nível de satisfação dos pacientes submetidos ao clareamento dental estão relatadas na literatura^{1,2,4}, porém, a presença de sensibilidade durante e após o tratamento é ainda um desafio para o cirurgião dentista, levando muitos pacientes a desistirem do tratamento.^{8,9} A sensibilidade está diretamente relacionada ao uso do agente clareador em alta concentração, principalmente o peróxido de hidrogênio.^{1,2,5,10} Devido ao baixo peso molecular, suas moléculas são capazes de se difundir através dos tecidos duros e alcançar a câmara pulpar, podendo resultar em danos irreversíveis à polpa.^{2,10}

Além disso, o uso de agentes clareadores tem gerado preocupações em relação aos efeitos adversos que estes podem provocar quando em contato com os tecidos periodontais, já que está comprovado que devido ao baixo peso molecular do peróxido este tem grande poder de difusão através dos tecidos duros.^{11, 12}

Escalas numéricas⁹ e questionários¹³ foram propostos para avaliar a irritação gengival após o procedimento clareador, contudo esses métodos são baseados somente na percepção do paciente.^{9,13} Exames histopatológicos também são utilizados e apresentam resultados precisos, contudo são invasivos, uma vez que é necessária a coleta de amostra do tecido gengival para análise histopatológica¹⁰.

A coleta do Fluido Crevico Gengival (FCG) é um método que se caracteriza por ser não invasivo e que tem sido bastante utilizado para avaliação da inflamação periodontal.^{16, 17, 18} O FCG é uma mistura de substâncias derivadas do soro sanguíneo, leucócitos, células estruturais do periodonto e microrganismos bucais¹⁸. Os níveis de monócitos mediadores da inflamação (prostaglandinas, citocinas e fator de necrose tumoral) encontrados no FCG são ideais para avaliação da saúde periodontal, o que faz com que o método seja considerado sensível e apropriado para avaliação da inflamação gengival.^{19, 20}

Concentrações diferentes de PH também poderiam ter manifestações diferentes sobre os tecidos gengivais, pelo que a utilização de métodos precisos e não invasivos para avaliar o grau de inflamação gengival após a aplicação do agente clareador são necessárias.

O Firatet *et al*¹⁷ avaliaram através da técnica de análise do fluido crevico gengival os efeitos de diferentes técnicas de clareamento sobre as IL-1beta e IL-10. No presente estudo iremos avaliar os efeitos do Peróxido de Hidrogênio à 15% e 35% sobre as

interleucinas pró-inflamatórias IL-1beta , IL-6, TFN e sobre as interleucinas anti-inflamatórias IL-10 e IL-4.

Sendo assim, esse estudo tem por objetivo avaliar a eficácia de agentes clareadores em diferentes concentrações e as citocinas encontradas no FCG de pacientes submetidos a clareamento em consultório com peróxido de hidrogênio bem como, a sensibilidade pós-operatória.

A hipótese nula testada é que não haverá diferença significativa na efetividade, níveis volumétricos das citocinas estudadas e na sensibilidade dos pacientes.

2. MATERIAS E MÉTODOS

2.1. Aspectos Éticos

Este estudo foi aprovado pelo comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Ceuma, sob o parecer de número 1.307. 220, e inscrito na base de dados primária para estudos clínicos ReBEC com o código de registro 4kkcd7. Todos os pacientes da pesquisa assinaram um Termo de Consentimento Livre Esclarecido (TCLE).

2.2. Delineamento do Estudo

Esta foi uma pesquisa clínica randomizada e duplo-cego, onde o avaliador e o paciente não sabiam qual material estava sendo utilizado. Para aplicação dos agentes clareadores foi utilizada a técnica split-mouth, ou boca dividida. O estudo foi conduzido de acordo com o CONSORT²⁰, no período de Março de 2016 à Junho de 2016.

2.3. Critérios de Inclusão e Exclusão

Este estudo foi desenvolvido nas clínicas de Odontologia da Universidade Ceuma, os pacientes incluídos eram alunos da universidade e deveriam ter entre 18 e 40 anos de idade e apresentavam boas condições de saúde geral e oral. Estes deveriam

ter pelo menos um dos incisivos centrais na cor A2 ou mais escuro quando comparados a escala Vita Classical (Vita Zahnfabrik, BadSackingen, Alemanha). Não deveriam apresentar restaurações, próteses e tratamento endodôntico nos seis dentes anteriores. Também deveriam ter disponibilidade para comparecer em todas as sessões.

Foram excluídos da pesquisa pacientes que haviam realizado algum procedimento clareador recentemente, lactantes, gestante, fumantes, com histórico de reações alérgicas ao peróxido, neoplasias na região de orofaringe, patologias tais como xerostomia, lesões de cárie, fraturas e trincas nos dentes que pudessem comprometer a saúde do paciente ou os resultados do estudo.

2.4. Cálculo Amostral

A variação de cor foi o desfecho primário do estudo. Com o objetivo de detectar uma diferença de 02 unidades de cor entre as médias dos grupos. O tamanho amostral mínimo calculado foi de 22 pacientes por grupo. O cálculo amostral foi realizado através do software Sealed Envelope, o poder do teste foi de 90% e o alfa de 5%.

2.5. Randomização

A randomização do estudo foi realizada utilizando o software Sealed Envelope. Esses envelopes continham o tipo de tratamento (Tabela 1), TA (Peróxido de hidrogênio a 15%) ou TB (Peróxido de hidrogênio a 35%), e eram embaralhados, em seguida oferecidos aos pacientes para que escolhessem um. O tratamento que estivesse assinalado no envelope escolhido pelo paciente era então aplicado no hemi-arco direito do paciente e o outro tratamento consequentemente era aplicado do lado esquerdo.

2.6. Grupos Experimentais

Tabela 1- Grupos experimentais, agentes clareadores, fabricante/lote, bem como composição.

Protocolo de Clareamento	Material	Composição	Tempo de Aplicação
PH à 15%	Lase Peroxide Lite- 15% (DMC/31167) (DMC, São Carlos, SP, Brasil)	Peróxido de hidrogênio 15%, espessante, fotocatalisador nanoparticulado , agente sequestrante, glicol e água.	45 minutos cada sessão
PH à 35%	Lase Peroxide Sensy- 35% (DMC/11065) (DMC, São Carlos, SP, Brasil)	Peróxido de hidrogênio 35%, espessante, corante, extratos vegetais, amida, agente sequestrante, glicol, água	45 minutos cada sessão

2.7. Procedimentos Clínicos

Antes da realização do clareamento todos pacientes passaram por procedimentos de profilaxia dental com pasta profilática Herjos (Coltene, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) e escova de Robson em baixa rotação para remoção de placa bacteriana e possíveis manchas extrínsecas. Os pacientes foram orientados a escovarem os dentes regularmente e usarem creme dental com flúor, e que não tivesse na sua composição dessensibilizante e clareador.

Para aplicar o agente clareador foi posicionado um afastador labial expandex (Indusbello, Londrina, PR, Brasil), os tecidos moles foram secos com seringa tríplice e protegidos por meio de uma barreira gengival Top Dam (FGM, Joinville, SC, Brasil), que foi fotopolimerizada (Ratii Cal, SDI, Victoria, Australia) durante 40 segundos. A barreira também foi aplicada na linha média, separando a hemi-arcada direita da esquerda, tanto no arco superior quanto no inferior, para aplicação da técnica da boca dividida.

Os agentes clareadores foram aplicados de acordo com protocolo estabelecido para a pesquisa sobre a superfície vestibular dos dentes seguindo a ordem determinada pela randomização. O produto foi mantido por 15 minutos, logo após, o gel foi removido com o auxílio de uma cânula de sucção (SS Plus, Maringá, PR, Brasil) e em seguida enxaguado abundantemente com água/ar para que uma nova aplicação fosse realizada, foram realizadas 3 aplicações em cada sessão e o intervalo entre as sessões foi de 7 dias. Foram realizadas 02 sessões de 45 minutos cada.

2.8. Avaliação da Cor

Antes da primeira aplicação dos agentes clareadores foi realizada a mensuração inicial da cor (baseline) dos seis dentes superiores (canino à canino) com auxílio de um espectrofotômetro Vita Easyshade® Advance 4.0 (Vita- Zahnfabrik, BadSackingen, Alemanha). Para aferir a cor foi confeccionada uma guia com silicone de condensação massa pesada Perfil® (Coltene, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) que foi manipulada de acordo com as orientações do fabricante e com o auxílio de um bisturi circular foram confeccionados orifícios no terço médio da superfície vestibular dos seis dentes anteriores superiores. Essa guia foi confeccionada com o objetivo de evitar influência da luminosidade externa e padronizar a leitura no terço médio do dente com espectrofotômetro. As aferições da cor foram realizadas em três tempos, antes do clareamento (baseline), 07 dias e 21 dias após.

A avaliação da cor também foi realizada através da escala Vita Classical (Vita- Zahnfabrik, Bad Säckingen, Alemanha), a escala foi organizada a partir do valor mais alto para o valor mais baixo. Esta avaliação foi realizada por um avaliador calibrado, que registrava a cor dos dentes de cada paciente antes da primeira e segunda sessão, e 21 dias após a sessão inicial.

2.9. Coleta do Fluido Crevico Gingival

Os dentes superiores, canino à canino, foram selecionados para coletar as amostras do FCG de forma a eliminar a possibilidade de contaminação com saliva. A área foi isolada com roletes de algodão e em seguida seca com seringa tríplice, as amostras foram coletadas sempre nos sulcos proximais dos dentes.

A coleta do FCG foi realizada com o auxílio de tiras de papel absorvente estandar, Periopaper® (OraFlow, Amityville, NY, EUA). As tiras foram introduzidas cerca de 1 a 2 mm de profundidade nos sulcos gengival por 15 segundos. Em seguida as tiras eram levadas ao Periotron 8000 (OraFlow, Amityville, NY, EUA) que é um equipamento eletrônico que quantifica o volume do FCG coletado e utiliza o software Periotron 8000 para converter os dados obtidos os dados para microlitros.

Após a análise no Periotron 8000 as tiras foram armazenadas em eppendorf e congeladas à -80°C. Todas as amostras foram coletadas sempre nos mesmos sítios e as coletas realizadas nos seguintes tempos:

- T0: Imediatamente antes da 1ª Sessão de clareamento;
- T1: Imediatamente depois da 2ª Sessão;
- T2: 24 horas após a 2ª Sessão
- T3: 21 dias após a 1ª Sessão

Tiras contaminadas com sangue ou saliva foram imediatamente excluídas e repetidas as coletas após 10 minutos.

2.10. Análise das Citocinas

A análise das citocinas (IL-1beta, IL-4, IL-6, IL-10, FNT) presentes no FCG foi realizada através do kit CBA (BD Cytometric Bead Array, San Jose, CA, EUA), de acordo com as instruções dos fabricantes. As amostras foram diluídas, vortexadas e centrifugadas para extração do sobrenadante. A quantidade de citocinas do fluido foi determinada em picogramas (pg).

2.11. Avaliação da Sensibilidade

Após a sessão de clareamento cada paciente respondeu a um questionário sobre a sensibilidade causada pelo procedimento. Foram utilizadas duas escalas de avaliação, a VAS (Escala Analógica Visual) e a NRS (Escala Numérica).

Na escala VAS o paciente registrava qualquer sensibilidade, fazendo um traço vertical em uma linha horizontal que mostra a sensibilidade variando de 0 (nenhuma sensibilidade) até 10 (sensibilidade extrema). Após isso foram realizadas as mensurações das marcações com um paquímetro digital^{21,22}.

Na Escala NRS o paciente qualifica o grau da sensibilidade provocada pelo procedimento em nenhuma sensibilidade (0), leve (1), moderada (2), considerável (3) e severa (4)^{21,22}.

Os pacientes registravam a sensibilidade, em diferentes tempos (imediatamente após, 1 hora, 24 e 48 horas após o clareamento) e de cada hemi-arco separadamente.

3. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística seguiu o protocolo de intenção de tratar e envolveu todos os participantes que foram alocados aleatoriamente²³. Em todos os testes estatísticos aplicados, o nível de significância foi de 5%.

Em cada tempo de avaliação, os dados de variação da cor em Δ SGU foram de duas unidades de guia para as diferenças entre os grupos e comparados com o teste de Mann Whitney. No caso de dados de Δ E, a cada tempo de avaliação os dados de mudança de cor para diferenças entre os grupos foram submetidos ao teste-t de Student para variáveis dependentes.

O risco absoluto de sensibilidade dentária foi comparado pelo teste de McNemar. A intensidade da sensibilidade dentária na escala de VAS foi comparada usando-se ANOVA e teste de Tukey e os dados obtidos a partir da escala NRS foram comparados por meio de testes de Mann-Whitney e Kruskal-Wallis.

Para análise do fluido gengival, foram avaliados os níveis volumétricos de citocinas IL-1beta, IL-4, IL-6, IL-10, e TNF, as quais foram submetidos a análise estatística das diferenças entre os grupos de estudo e em cada tempo de avaliação com testes não paramétricos uma vez que a distribuição de dados não foi normal. As diferenças entre os grupos a cada tempo foram avaliadas por meio do teste de Wilcoxon pareado.

4. RESULTADOS

4.1. Características dos participantes incluídos

Um total de 31 participantes foram examinados a fim de verificar se estavam de acordo com os critérios de inclusão e exclusão da pesquisa, sendo selecionados 22 pacientes. A cor inicial (baseline)

dos incisivos centrais dos participantes foi semelhante em ambas as escala de cores (Tabela 2).

Tabela 2– Médias e desvios-padrões da idade, bem como a cor inicial dos pacientes participantes do estudo para todos os grupos experimentais.

Características		PH 15%	PH 35%
Idade (média ± DP, anos)		24.09± 5.4	
Cor	Baseline(média±DP, SGU)	7.5 ± 2.57	7.68 ± 2.66

SGU – Valores da escala Vita Classical.

4.2. Adesão ao protocolo e desistências

Três participantes não compareceram a visita retorno de um mês. Para esses participantes, a última observação foi levada com finalidade estatística para manter a análise com intenção de tratar²⁰. A Figura 1 mostra o fluxograma nas diferentes fases do desenho do estudo.

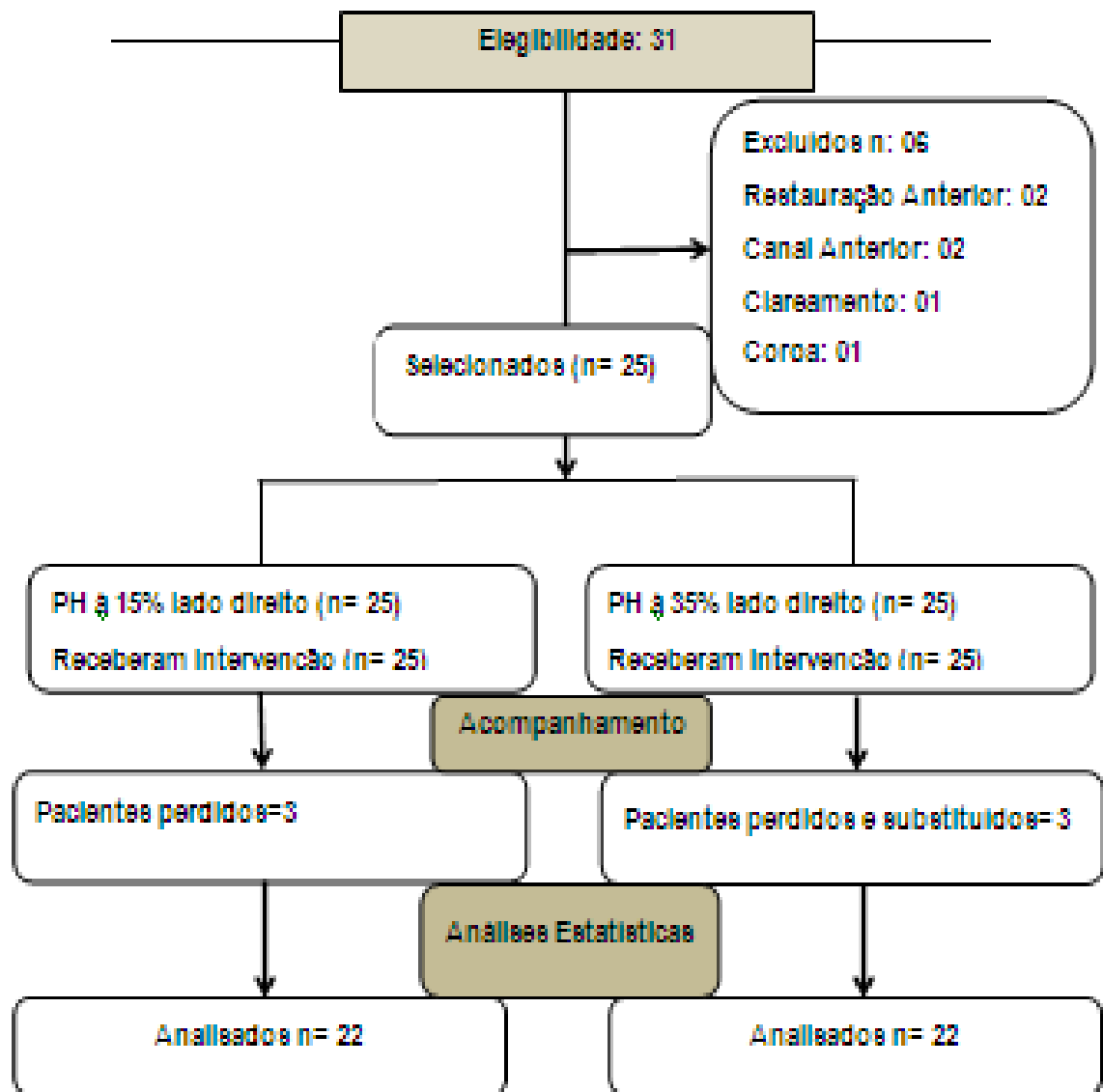


Figura 1- Fluxograma com os números de pacientes incluídos no ensaio clínico de acordo com o CONSORT 2010.

4.3. Avaliação da Cor

Diferenças significativas foram observadas em ambos os grupos de estudo sob os dois métodos de avaliação. O PH a 35% mostrou maior grau de clareamento na segunda semana de clareamento (Vita Classical, e espectrofotômetro) que o PH a 15%. Após 1 mês do clareamento, o PH a 35% produziu maior grau de clareamento que o PH a 15% ($p = 0,02$ para o espectrofotômetro)(Tabela 3).

4.4. Sensibilidade dentária

Os riscos de sensibilidade dentária para ambos os grupos foram estatisticamente significantes ($p > 0,001$) (Tabela 4) com maior risco absoluto de sensibilidade para PH 35%. A intensidade da sensibilidade dentária dos diferentes grupos foi estatisticamente diferente para ambas as escalas ($p = 0,02$ e $p = 0,001$ para escala VAS e NRS, respectivamente) (Tabela 5). A utilização de PH 35% gerou um nível mais elevado de intensidade de sensibilidade até 1h depois, quando comparado com PH 15% (tabela 5).

Tabela 3- Médias e desvios-padrões de Δ SGU obtidos com o Vita Classical e Δ E obtidos por espectrofotômetro (Vita Easyshade) em diferentes períodos, assim como análise estatística (*)

Períodos	Δ SGU (Vita Classical)		p-valor (*)	Δ E (Vita Easyshade)		p-valor (**)
	15%	35%		15%	35%	
	1 semana	5,2 \pm 2,3		5,1 \pm 2,3	0,35	
2 semanas	5,3 \pm 2,2	5,7 \pm 2,3	0,04	7,2 \pm 2,4	9,4 \pm 3,2	0,01
1 mês	5,5 \pm 2,5	6,0 \pm 2,5	0,48	6,9 \pm 2,6	8,7 \pm 3,0	0,02

(*) *Teste de Mann Whitney*; (**) *T-teste para variáveis dependentes*

Tabela 4– Comparação do número de pacientes que apresentaram sensibilidade dentária (SD), pelo menos uma vez durante o tratamento em ambos os grupos, risco absoluto e razão do risco (*).

Tratamento	Número de participantes com Sensibilidade dentária (NRS)		Risco Absoluto* (95% CI)	Razão do risco (95% CI)
	Sim	Não		
PH 15%	09	13	41 (23-61)	2,2 (1,3–3,7)
PH35%	20	02	90 (72-97)	

(*)*Teste de Mcnemar*($p = 0.001$)

Tabela 5– Intensidade de sensibilidade dentária (média ± desvio-padrão) nos diferentes pontos de avaliação para ambos os grupos de estudo e comparação estatística.

Tempos de Avaliação	Escala VAS (*)		Escala NRS (**)	
	PH15%	PH 35%	PH15%	PH35%
Até 1 h	1,16 ± 2,1 A	4,4 ± 3,3 B	0 (0/1) a	2 (1/3) b
1 h até 24 h	0,34 ± 1,17 A	1,49 ± 2,0 A	0 (0/0) a	0 (0/1) a
24 h até 48 h	0,09 ± 0,4 A	0,08 ± 0,3 A	0 (0/0) a	0 (0/0) a

* Média ± desvio padrão: ANOVA unidirecional e teste de Tukey (p = 0,01)

** Mediana (intervalo interquartil): teste de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney (p = 0,002). Os valores identificados com a mesma escala superior (escala VAS) ou letras minúsculas (escala NRS) são estatisticamente semelhantes.

4.5. Análise das Citocinas

Não houve diferenças estatisticamente significativas entre as concentrações de todos os níveis volumétricos de IL-1beta (Tabela 6), IL-4, IL-6 (Tabela 7) e IL-10, e TNF (Tabela 7) quando ambos os grupos são comparados imediatamente depois da segunda sessão de clareamento (T1), um dia depois do clareamento (T2), ou 1 mês após (T3). Houve diferença estatística significativa somente no grupo da IL-1 no T3.

Tabela 6- Médias e desvios-padrões de (μ_{Log}) dos níveis volumétricos de IL-1beta no início (T0), imediatamente após o clareamento (T1), 24 h após o clareamento (T2) e após 1 mês após o clareamento (T3), assim como análise estatísticas (*)

Períodos	IL-1beta		p-valor(*)
	15%	35%	
$\Delta (T0 - T1)$	0,78 \pm 0,56	-0,044 \pm 0,75	0,18
$\Delta (T0 - T2)$	0,71 \pm 0,714	0,72 \pm 0,54	0,53
$\Delta (T0 - T3)$	0,66 \pm 0,85	- 0,008 \pm 0,57	0,003

(*) *Teste de Wilcoxon pareado*

Tabela7– Médias e desvios padrão de (μ_{Log}) dos níveis de IL-4 e IL-6 no início (T0), imediatamente após o clareamento(T1), 24 h após o clareamento (T2) e após 1 mês após o clareamento (T3),assim como a análise estatística (*).

Períodos	IL-4		p-valor (*)	IL-6		p-valor(*)
	15%	35%		15%	35%	
Δ (T0 – T1)	-0,06± 0,71	0,02 ± 0,81	0,71	10,55± 24,11	-0,18 ± 5,77	0,15
Δ (T0 – T2)	-0,12± 0,79	-0,073 ± 0,16	0,89	-1,19 ± 5,33	-2,19 ± 4,44	0,92
Δ (T0 – T3)	-0,20 ± 0,49	- 0,02 ± 0,21	0,86	-1,73 ± 5,21	-1,76 ± 4,57	0,79

(*) *Teste Wilcoxon pareado.*

Tabela 8- Médias e desvios- padrão de (μ_{Log}) dos níveis de IL-10, e TNF no início (T0), imediatamente após o clareamento (T1), 24 h após o clareamento (T2) e após 1 mês após o clareamento (T3), assim como a análise estatística (*)

Periods	IL-10		p-value (*)	TNF		p-value (*)
	15%	35%		15%	35%	
Δ (T0 –T1)	0,51 \pm 1,12	0,21 \pm 0,33	0,37	1,38 \pm 3,34	-0,24 \pm 1,27	0,28
Δ (T0 –T2)	-0,14 \pm 0,83	-0,05 \pm 0,31	0,51	0,62 \pm 2,93	-0,97 \pm 3,49	0,86
Δ (T0 –T3)	0,20 \pm 0,94	-0,37 \pm 0,96	0,79	1,15 \pm 4,95	-0,43 \pm 3,48	0,42

(*) *Teste Wilcoxon pareado.*

5. DISCUSSÃO

A hipótese nula testada neste trabalho foi rejeitada, pois houve diferença significativa com relação a efetividade para as diferentes concentrações de PH testadas. Também houve diferença significativa com relação aos níveis volumétricos das citocinas do fluido gengival após 01 mês de clareamento para a IL-1beta, e em relação sensibilidade pós-operatória.

A efetividade do clareamento dental é medida através da seleção de cor com escalas que são métodos subjetivos, e com o espectrofotômetro que é um método de avaliação objetivo. A avaliação através das escalas de cor pode ser influenciada por fatores externos como luminosidade e fadiga visual do avaliador ¹⁷, já o espectrofotômetro é uma escala de cor digital portátil que é compatível com as escalas Vita 3D-Master, Vita 3D-Master Bleaching e com a Vitapan Classical. Neste estudo foram utilizados ambos métodos para avaliar a efetividade de cor alcançada pelos agentes clareadores.

Os métodos de avaliação mostraram que o PH a 35% produziu maior grau de clareamento que o PH a 15% na segunda semana e/ou 1 mês depois. Estes achados divergem dos resultados do estudo realizado por Bertoloro *et al.*¹ que mostram diferença significativa entre o PH a 35% e o PH a 15%, sendo que neste último houve maior grau de efetividade. Estas diferenças podem ser justificadas devido à protocolos de aplicação diferentes utilizados nos estudos.

O clareamento é responsável por alguns efeitos adversos^{11,12,24,25} dentre eles a sensibilidade dental é bastante relatada pelos pacientes que se submetem ao procedimento clareador^{1,2,24,26}, e está relacionada a diversos fatores tais como

concentração do agente clareador, tempo de exposição dos dentes ao agente clareador, número de aplicações, e outros fatores^{1,2, 24}

O PH 35% mostrou-se mais propenso a gerar maior sensibilidade dentária até 1h depois do procedimento clareador, quando comparado com PH 15%. Estes resultados também são encontrados em outros estudos^{1, 2, 25}, o que leva a concluir que o PH em baixas concentrações oferece como vantagem desenvolver menor grau de sensibilidade e maior segurança podendo ser utilizado mesmo naqueles pacientes com risco de desenvolver sensibilidade severa.

Estudos de toxicologia dos agentes clareadores apontam que o peróxido de hidrogênio produz radicais livres que causam danos às células dos tecidos biológicos^{1, 26}. Quando os níveis de radicais livres dos peróxidos sobrecarregam os mecanismos de proteção celulares, estes representam perigo para a saúde, podendo causar necrose e/ou ulcerações de tecidos moles e duros²⁵, por isto a importância da análise dos efeitos dos agentes clareadores sobre os tecidos periodontais. A técnica que utiliza os elementos do FCG é bastante sensível e capaz de detectar as alterações inflamatórias a nível celular através da análise das citocinas encontradas, e já é utilizado no diagnóstico e monitoramento das doenças periodontais^{17,18}.

As citocinas IL- 1beta, IL- 6, TFN são conhecidas como citocinas pró-inflamatórias, capazes de induzir a osteólise por meio da estimulação da reabsorção óssea por osteoclastos^{16,28,31,37,38}. A associação entre a periodontite e níveis elevados de IL-1beta no fluido crevicular gengival está bem estabelecida^{29,37}. Estudos mostraram^{30,32,33} níveis significativamente mais elevado de interleucina-1 beta em pacientes com periodontite em comparação com os saudáveis. Além disso, o estudo de Kaushiket *al.*³³ mostra que os níveis de interleucina-1beta diminuiu após tratamento periodontal.

A IL-6 desempenha um importante papel na reabsorção óssea, apresentando efeitos similares a IL-1beta e TNF na formação de osteoclastos³⁷. Apesar da IL-6 ser encontrada nos tecidos gengivais clinicamente saudáveis, a sua secreção mostra-se mais acentuada em sítios de inflamação periodontal, estando essa citocina intimamente associada à atividade da doença^{18, 34, 35}.

O TNF está diretamente envolvido na patogênese da doença periodontal como mediador da destruição tecidual, e também promove reabsorção óssea, atuando sinergicamente com a IL-1beta e a IL-6^{16,18,28}.

Neste estudo o comportamento destas citocinas nos pacientes submetidos ao clareamento dental com as concentrações estudadas apresentaram comportamentos similares aos achados do estudo de Firat *et al.*¹⁷, no qual a IL-1beta não apresentou diferenças estatisticamente significante no grupo do clareamento caseiro e do clareamento quimicamente ativado para os diferentes tempos. Somente no grupo do clareamento ativado por luz, após 15 dias a IL-1beta apresentou diferença estatística significante, assim como o presente estudo, que mostrou diferença estatística significante para IL-1beta após 21 dias. Esse resultado sugere que estudos com um acompanhamento maior após o clareamento deve ser realizado para explicar possíveis respostas inflamatórias tardias após tratamento clareador.

As IL-4 e IL-10 são citocinas anti-inflamatórias, a intensidade, duração e reabsorção óssea provocada por um processo inflamatório é regulada pelo balanceio entre as citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias^{16,31}. Segundo relatos de Lins *et al.*³⁹, a IL-4 e IL-10 são responsáveis pela regulação da produção de citocinas pró-inflamatórias, como a IL-1beta, IL-6 e TNF.

Toker *et al.*³² relataram que a IL-10 apresentou aumento dos níveis com a intensificação da inflamação, desempenhando um

papel importante na patogênese da doença periodontal, especialmente na regulação da produção de citocinas IL-1beta. Neste estudo a IL-10 e a IL-4 não mostraram diferenças estatisticamente significante em nenhum dos grupos e em nenhum dos tempos estudados, o que está de acordo com os resultados de Firat *et al.*,¹⁷, o que sugere que o nível de inflamação provocado pelo procedimento clareador não foi suficiente para desencadear a produção das citocinas IL-10 e IL-4.

6. CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos é possível concluir que:

- O agente clareador de maior concentração produziu maior nível de clareamento e sensibilidade.
- O fluido crevico gengival não mostrou quantidade de inflamação suficiente para desencadear o aumento das citocinas estudadas, sendo somente encontrado um aumento das citocinas IL beta, após 21 dias de clareamento.

BIBLIOGRAFIA

1. Bortolatto JF, Pretel H, Floros MC, Luiz ACC, Dantas AAR, Fernandez E, Moncada G, de Oliveira Jr. OB (2014) Low Concentration H₂O₂/TiO₂ in Office Bleaching: A Randomized Clinical Trial *Journal Dental Research* **93** 66.
2. Moncada G, Sepúlveda D, Elphick K, Contente M, Estay J, Bahamondes V, Fernandez E (2013) Effects of Light Activation, Agent Concentration, and Tooth Thickness on Dental Sensitivity After Bleaching *Operative Dentistry* **38-5** 467-476.
3. Joiner A (2006) The bleaching of teeth: A review of the literature *Journal of Dentistry* **34(7)** 412-419.

4. Joiner A (2004) Tooth colour: A review of the literature *Journal of Dentistry* **32(1)** 3-12.
5. Santana MAP, Nahsan FP, Oliveira AHA, Loguercio AD, Faria-e-Silva AL (2014) Randomized Controlled Trial of Sealed In-Office Bleaching Effectiveness. *Brazilian Dental Journal* **25(3)** 207-211.
6. Farmer DS, Burcham P, Marin PD (2006) The ability of thiourea to scavenge hydrogen peroxide and hydroxyl radicals during the intra-coronal bleaching of bloodstained root-filled teeth *Australian Dental Journal* **51** 146- 152.
7. Reis A, Kossatz S, Martins CG, Loguercio AD (2013) Efficacy of and Effect on Tooth Sensitivity of In-office Bleaching Gel Concentrations: A Randomized Clinical Trial *Operative Dentistry* **38-4**, 386-393.
8. Bonafé E, Loguercio AD, Reis A, Kossatz S (2014) Effectiveness of a desensitizing agent before in office tooth bleaching in restored teeth. *Clinical Oral Investigation* **18** 839-845.
9. Leonard RH Jr, Garland GE, Eagle JC, Caplan DJ (2002) Safety issues when using a 16% carbamide peroxide whitening solution *Journal of Esthetic and Restorative Dentistry* **14** 358- 367.
10. Costa CA, Riehl H, Kina JF, Sacono NT, Hebling J (2010) Human pulp responses to in-office tooth bleaching *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology* **109** 59-64.
11. Hannig C, Lindner D, & Attin T (2007) Efficacy and tolerability of two home bleaching systems having different peroxide delivery *Clinical Oral Investigations* **11(4)** 321-329.
12. Walsh LJ (2000) Safety issues relating to the use of hydrogen peroxide in dentistry *Australian Dental Journal* **45(4)** 257-269.

13. Zekonis R, Matis BA, Cochram MA, AL Shetri SE, Eckert GL, Carlson TJ (2003) Clinical evaluation of in-office and at-home bleaching treatments. *Operative Dentistry* **28** 114-121.
14. Leonard RH Jr, Smith LR, Garland GE, Caplan DJ (2004) Desensitizing agent efficacy during whitening in an at-risk population *Journal of Esthetic and Restorative Dentistry* **16** 49-55.
15. Costa Filho LC, Costa CC, Sória ML, Taga R (2002) Effect of home bleaching and smoking on marginal gingival epithelium proliferation: A histologic study in women *Journal of Oral Pathology & Medicine* **31** 473-480.
16. Okada H. & Murakami S (1998) Cytokine expression in periodontal health and disease *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine* **9(3)** 248-266.
17. Firat E, Ercan E, Gurgan S, Yalcin Cakir F, Berker E (2004.) The effect of bleaching systems on the gingiva and the levels of IL-1 β and IL-10 in gingival crevicular fluid. *Operative Dentistry* **36** 572-580.
18. Chibebe PC, Terreri M, Ricardo LH, Pallos D (2008) An actual view of gingival crevicular fluid as a periodontal diagnosis method. *Journal of Medical Science* **17** 167-173.
19. Almas K, Al-Harbi M, & Al-Gunaim M. The effect of a 10% carbamide peroxide home bleaching system on the gingival health *Journal of Contemporary Dental Practice* **4(1)** 32-41.
20. Schulz KF, Altman DG, Moher D & Group C (2011) CONSORT 2010 statement: updated guidelines for reporting parallel group randomised trials *International Journal of Surgery* **9(8)** 672-677.

21. Bernardon JK, Sartori N, Ballarin A, et al. (2010) Clinical performance of vital bleaching techniques. *Operative Dentistry* **35**(1):3- 10.
22. Krause F, Jepsen S, Braun A. (2008) Subjective intensities of pain and contentment with treatment outcomes during tray bleaching of vital teeth employing different carbamide peroxide concentrations *Quintessence International* **39**(3): 203-9.
23. Kossatz S, Dlanhol AP, Cunha T, Loguercio AD, Reis A (2011) Effect of light activation on tooth sensitivity after in-office bleaching *Operative Dentistry* **36-3**, 251-257.
24. Giovana AK, Freire A, Lima AAS, Ignácio AS, Souza EM (2009) Effect of reservoirs on gingival inflammation after home dental bleaching *Quint Intern* **4(3)** 195-201.
25. Tredwin CJ, Naik S, Lewis NJ, Scully CCBE (2006) Hydrogen peroxide tooth-whitening (bleaching) products: Review of adverse effects and safety issues. *British Dental Journal* **200**:371-376.
26. Benetti AR, Valera MC, Mancini MN, Miranda CB, & Balducci I (2004) In vitro penetration of bleaching agents into the pulp chamber *International Endodontic Journal* **37(2)** 120-124.
27. Naik S, Tredwin CJ, Scully C. (2006) Hydrogen peroxide tooth-whitening (bleaching): Review of safety in relation to possible carcinogenesis *Oral Oncology* **42** 668-674.
28. Wang C; Tani-Ishii; Stashenko P (1997) Bone-resorptive cytokine gene expression in periapical lesion in the rat. *Oral Microbiology Immunology* **2** 65-71.
29. Lins RDAU, Pequeno MV, Melo JPLC, Ferreira RCQ, Silveira EJD, Dantas EM (2006) Bone Resorption in Periodontal Disease: the role of cytokines and prostaglandins *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery and Traumatology* 29-35.

30. Barksby HE, Lea SR, Preshaw PM, Taylor JJ (2007) The expanding family of interleukin-1 cytokines and their role in destructive inflammatory disorders *Clinical & Experimental Immunology* **149** 217–225.
31. Jaedicke KM, Philip M. TAYLOR. P& JJ (2010) Salivary cytokines as biomarkers of periodontal diseases. *Periodontology 2000* **70** 164–183.
32. Toker H, Poyraz O, & Eren K (2008) Effect of periodontal treatment on IL-1beta, IL-1ra, and IL-10 levels in gingival crevicular fluid in patients with aggressive periodontitis *Journal of Clinical Periodontology* **35(6)** 507-513.
33. Kinney JS, Morelli T, Braun T, Ramseier CA, Herr AE, Sugai JV, Shelburne CE, Rayburn LA, Singh AK, Giannobile WV (2011) Saliva/pathogen biomarker signatures and periodontal disease progression *Journal Dental Research* **90** 752–758.
34. Kaushik R, Yeltiwar RK, Pushpanshu K (2011) Salivary interleukin-1beta levels in patients with chronic periodontitis before and after periodontal phase I therapy and healthy controls: a case-control study. *Journal Periodontology* **82** 1353–1359.
35. Irwin CR, Myrillas TT (1998) The role of IL-6 in the pathogenesis of periodontal diseases. *Oral Diseases* **4** 43-47.
36. Lu HK, Chen YL, Chang HC, Li CL, Kuo MY (2006) Identification of the osteoprotegerin/receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand system in gingival crevicular fluid and tissue of patients with chronic periodontitis. *Journal of Periodontal Research* **41(4)** 354-60.
37. Ziebolz D, Helms K, Hannig C, & Attin T (2007) Efficacy and oral side effects of two highly concentrated tray-based bleaching systems. *Clinical Oral Investigations* **11(3)** 267-275.

- 38.** Lima V, Bezerra MM, Leitão RFC, Brito GAC, Rocha FAC, Ribeiro RA (2008) Main inflammatory mediators involved in the physiopathology of periodontitis- role of pharmacological modulators. *R. Perio* **18(3)** 7-19.
- 39.** Lins RDAU, Pequeno MV, Melo JPLC, Ferreira RCQ, Silveira EJD, Dantas EM (2006) Bone Resorption in Periodntal Disease: the role of cytokines and prostaglandins. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery and Traumatology* 29-35.
- 40.** Yuka I; · Yoshitaka H, · Takehiko K, Yasuaki S, · Paul KN · Ihachi K. (1998) Differential expression of IFN-g, IL-4, IL-10, and IL-1b mRNAs in decalcified tissue sections of mouse lipopolysaccharide-induced periodontitis mandibles assessed by in situ hybridization. *Histochemistry and Cell Biology* 109:339–347.

ANEXOS

MATERIAS E MÉTODOS

Aspectos Éticos

Este estudo foi aprovado pelo comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Ceuma, sob o parecer de número 1.307. 220, e inscrito na base de dados primária para estudos clínicos ReBEC com o código de registro 4kkcd7. Todos os pacientes da pesquisa assinaram um Termo de Consentimento Livre Esclarecido (TCLE).

Delineamento do Estudo

Este estudo foi uma pesquisa clínica randomizada e duplo-cego, onde o avaliador e o paciente não sabiam qual material estava sendo utilizado. Para aplicação dos agentes clareadores foi utilizada a técnica split-mouth, ou boca dividida. O estudo foi conduzido de acordo com o CONSORT²⁰, de período de Março de 2016 à Junho de 2016.

Crítérios de Inclusão e Exclusão

Este estudo foi desenvolvido nas clínicas de Odontologia da Universidade Ceuma. Os pacientes incluídos eram aluno da universidade e deveriam ter entre 18 e 40 anos de idade e apresentavam boas condições de saúde geral e oral. Estes deveriam ter pelo menos um dos incisivos centrais na cor A2 ou mais escuro quando comparados a escala Vita Classical (Vita Zahnfabrik, BadSackingen, Alemanha) (Figura 2). Não deveriam apresentar restaurações, próteses e tratamento endodôntico nos seis dentes anteriores. Também deveriam ter disponibilidade para comparecer em todas as sessões.



Figura 2: Avaliação de cor para seleção dos pacientes da amostra do estudo.

Foram excluídos da pesquisa pacientes que haviam realizado algum procedimento clareador recentemente, lactantes, gestante, fumantes, com histórico de reações alérgicas ao peróxido, neoplasias na região de orofaringe, patologias tais como xerostomia, lesões de cárie, fraturas e trincas nos dentes que pudessem comprometer a saúde do paciente ou os resultados do estudo.

Cálculo Amostral

A variação de cor foi o desfecho primário do estudo. Com o objetivo de detectar uma diferença de 02 unidades de cor entre as médias dos grupos, o tamanho amostral mínimo calculado foi de 22 pacientes por grupo. O cálculo amostral foi realizado através do software Sealed Envelope, o poder do teste foi de 90% e o alfa de 5%.

Randomização

A randomização do estudo foi realizada utilizando o software Sealed Envelope. Esses envelopes continham o tipo de tratamento (Tabela 1), TA (Peróxido de hidrogênio a 15%) ou TB (Peróxido de hidrogênio a 35%), e eram embaralhados, em seguida oferecidos

aos pacientes para que escolhessem um. O tratamento que estivesse assinalado no envelope escolhido pelo paciente era então aplicado no hemi-arco direito do paciente e o outro tratamento conseqüentemente era aplicado do lado esquerdo.

Grupos Experimentais

Tabela 1: Grupos experimentais, agentes clareadores, fabricante/lote, bem como composição.

Protocolo de Clareamento	Material	Composição	Tempo de Aplicação
PH à 15%	Lase Peroxide Lite- 15% (DMC/31167) (DMC, São Carlos, SP, Brasil)	Peróxido de hidrogênio 15%, espessante, fotocatalisador nanoparticulado, agente sequestrante, glicol e água.	45 minutos cada sessão
PH à 35%	Lase Peroxide Sensy- 35% (DMC/11065) (DMC, São Carlos, SP, Brasil)	Peróxido de hidrogênio 35%, espessante, corante, extratos vegetais, amida, agente sequestrante, glicol, água	45 minutos cada sessão



Figura 3: Lase Peroxide Lite-15%



Figura 4: Lase Peroxide Sensy-35%

Procedimentos Clínicos

Antes da realização do clareamento todos pacientes passaram por procedimentos de profilaxia dental com pasta profilática Herjos (Coltene,Rio de Janeiro, RJ, Brasil) e escova de Robson em baixa rotação para remoção de placa bacteriana e possíveis manchas extrínsecas (Figura 5). Os pacientes foram orientados a escovarem os dentes regularmente e usarem creme dental com flúor, e que não tivesse na sua composição dessensibilizante e clareador.



Figura 5: Profilaxia antes da primeira sessão de clareamento.

Para aplicar o agente clareador foi posicionado um afastador labial expandex (Indusbello, Londrina, PR, Brasil), os tecidos moles foram secos com seringa tríplice e protegidos por meio de uma barreira gengival Top Dam (FGM, Joinville, SC, Brasil), que foi fotopolimerizada (Radii Cal, SDI, Victoria, Austrália) durante 40 segundos. A barreira também foi aplicada na linha média, separando a hemi-arcada direita da esquerda, tanto no arco superior quanto no inferior, para aplicação da técnica da boca dividida (Figura 6).

Os agentes clareadores foram aplicados de acordo com as especificações dos fabricantes e aplicados sobre a superfície vestibular dos dentes seguindo a ordem determinada pela randomização. O produto era mantido por 15 minutos, logo após, o gel era removido com o auxílio de uma cânula de sucção (SS Plus, Maringá, PR, Brasil) e em seguida enxaguado abundantemente com água/ar para que uma nova aplicação fosse realizada, foram realizadas 3 aplicações em cada sessão e o intervalo entre cada sessão era de 7 dias. Foram realizadas 02 sessões de 45 minutos cada (Figura 6).



Figura 6: Aplicação de barreira gengival (aplicação da barreira também na linha média para aplicação do protocolo de boca dividida). Aplicação dos agentes clareadores de acordo com a randomização.

Avaliação da Cor

Antes da primeira aplicação dos agentes clareadores foi realizada a mensuração inicial da cor (baseline) dos seis dentes superiores (canino à canino) com auxílio de um espectrofotômetro Vita Easyshade® Advance 4.0 (Vita- Zahnfabrik, BadSackingen, Alemanha) (Figura 7).



Figura 7: Espectrofotômetro Vita Easyshade® Advance 4.0

Para aferir a cor foi confeccionada uma guia com silicone de condensação massa pesada Perfil® (Coltene, Riod de Janeiro, RJ, Brasil) que foi manipulada de acordo com as orientações do fabricante e com o auxílio de um bisturi circular foram confeccionados orifícios no terço médio da superfície vestibular dos seis dentes anteriores superiores (Figura 8). Essa guia foi confeccionada de acordo com as orientações da American Dental Association com o objetivo de evitar influência da luminosidade externa e padronizar a leitura no terço médio do dente com espectrofotômetro. As aferições da cor foram realizadas em três tempos, antes do clareamento (baseline), 07 dias e 21 dias após.



Figura 8: Guia de Silicone

A avaliação da cor também foi realizada através das escala Vita Classical (Vita- Zahnfabrik, BadSackingen, Alemanha) (Figura 9), a escala foi organizada a partir do valor mais alto para o valor mais baixo. Esta avaliação foi realizada por um avaliador calibrado, que registrava a cor dos dentes de cada paciente antes da primeira e segunda sessão, 14 e 21 dias após a sessão inicial.



Figura 9: Escala de cor Vitapan Classical

Coleta do Flúido Crevico Gengival

Os dentes superiores, de canino à canino, foram selecionados para coletar as amostras do FCG de forma a eliminar a possibilidade de contaminação com saliva. A área foi isolada com roletes de algodão e em seguida seca com seringa tríplice, as amostras foram coletadas nos sulcos proximais dos seis dentes superiores de cada paciente.

A coleta do FCG foi realizada com o auxílio de tiras de papel absorvente estandar, Periopaper® (Ora Flow, Amityville, NY, EUA) (Figura 10).



Figura 10: Tiras de Papel Absorvente Periopaper®

As tiras foram introduzidas cerca de 1 a 2 mm de profundidade nos sulcos gengival por 15 segundos (Figura 11).



Figura 11: Coleta do FCG

Em seguida as tiras eram levadas ao Periotron 8000 (Ora Flow, Amityville, NY, EUA) que é um equipamento eletrônico que quantifica o volume do FCG coletado e utiliza o software Periotron 8000 para converter os dados obtidos os dados para microlitros. (Figura 12).

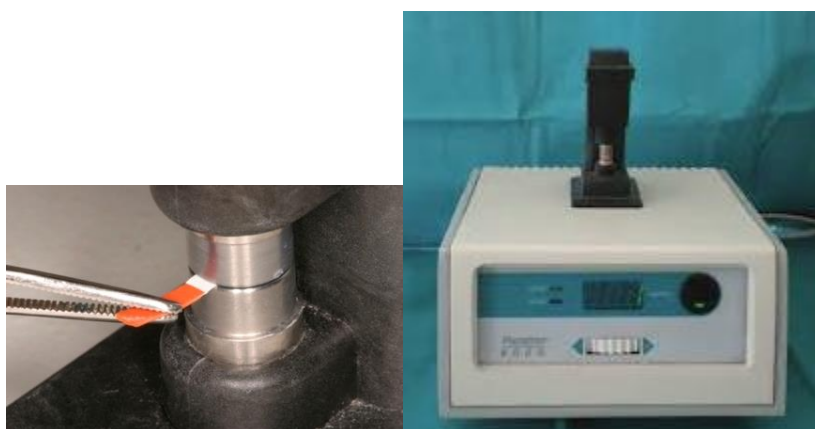


Figura 12: Leitura da coleta do FCG com as tiras pelo Periotron 8000.

Após a análise no Periotron 8000 as tiras foram armazenadas em eppendorf e congeladas à -80°C . Todas as amostras foram coletadas sempre nos mesmos sítios e as coletas realizadas nos seguintes tempos:

- T0: Imediatamente antes da 1ª Sessão de clareamento;
- T1: Imediatamente depois da 2ª Sessão;
- T2: 24 horas após a 2ª Sessão
- T3: 21 dias após a 1ª Sessão

Tiras contaminadas com sangue ou saliva foram imediatamente excluídas e repetidas as coletas após 10 minutos.

Análise das Citocinas

A análise das citocinas (IL-1beta, IL-4, IL-6, IL-10, FNT) presentes no FCG foi realizada através do kit CBA (BD Cytometric BeadArray, San Jose, CA, EUA), de acordo com as instruções dos fabricantes. As amostras foram diluídas, vortexadas e centrifugadas para extração do sobrenadante. A quantidade de citocinas do fluido foi determinada em picogramas (pg).

Avaliação da Sensibilidade

Após as sessão de clareamento cada paciente respondeu a um questionário sobre a sensibilidade causada pelo procedimento. Foram utilizadas duas escalas de avaliação, a VAS (Escala Analógica Visual) e a NRS (Escala Numérica).

Na escala VAS o paciente registrava qualquer sensibilidade, fazendo um traço vertical em uma linha horizontal que mostra a sensibilidade variando de 0 (nenhuma sensibilidade) até 10 (sensibilidade extrema). Após isso foram realizadas as mensuração das marcações com um paquímetro digital ^{21,22}.

Na Escala NRS o paciente qualifica o grau da sensibilidade provocada pelo procedimento em nenhuma sensibilidade (0), leve (1), moderada (2), considerável (3) e severa (4) ^{21,22}.

