

1. Introdução

O clareamento dental vem sendo estudado desde o século XIX, buscando definir técnicas que sejam eficazes para restituir a estética dos dentes com alteração cromática. Buscam-se também materiais que apresentem baixos efeitos deletérios sobre os tecidos adjacentes.

O primeiro protocolo de clareamento em dentes desvitalizados foi preconizado por Bogue em 1872, utilizando-se o ácido oxálico. Desde então, inúmeras outras metodologias foram propostas (Attin *et al.*, 2003). As técnicas atuais são baseadas na utilização do peróxido de hidrogênio (uso direto) ou de produtos que, ao reagirem, liberam peróxido de hidrogênio de forma mais lenta. Independente da técnica utilizada, a ação clareadora é proporcionada pela reação do oxigênio ativo, derivado da quebra do peróxido de hidrogênio, junto à matriz orgânica do dente.

Embora eficientes no que diz respeito ao aspecto estético, as técnicas de clareamento são questionáveis quanto a sua toxicidade sobre os tecidos periodontais. Em 1979, Harrington & Natkin sugeriram que o tratamento clareador em dentes desvitalizados correlacionava-se ao surgimento de reabsorção cervical externa.

A reabsorção externa é um fenômeno de origem inflamatória que ocorre imediatamente abaixo da inserção epitelial do dente, podendo ou não coincidir com a área cervical do mesmo (Makkes & Thoden, 1975; Andreasen, 1981; Tronstad, 1988). Esta se dá gradualmente, e leva a uma perda irreversível do tecido cementário, dentinário e ósseo. Sua patogenia, ainda desconhecida, é

rotineiramente associada a diversas causas, sendo uma delas o tratamento clareador endógeno.

Após a instalação desse quadro, é necessário a definição correta da localização e extensão da destruição a fim de se instituir uma terapia adequada. Quando possível, a curetagem cirúrgica do tecido acometido e a adequada restauração radicular podem viabilizar a manutenção do elemento dental. Diversos materiais foram propostos para a restauração subgingival desses defeitos, de forma a possibilitar a repopulação celular e o reparo do periodonto adjacente (Yilmaz *et al.*, 2010). Muito utilizados, por suas habilidades de presa, selamento e biocompatibilidade, destacam-se o cimento MTA (agregado trióxido mineral) e o restaurador resinoso/ionomérico Geristore[®] (Mehrvarzfar *et al.* 2010). Outro interessante produto, muito utilizado em reparos periodontais é o Emdogain[®], cujo principal constituinte é a amelogenina, substância importante na amelogênese, e que apresenta comprovado efeito inibidor da osteoclastogênese bem como da reabsorção óssea e radicular (Yagi *et al.*, 2011).

Sabe-se que as principais células envolvidas no metabolismo ósseo, mais especificamente na sua remodelação, são os osteoclastos e osteoblastos. Quando associada a processos patológicos, a fisiologia óssea é alterada e passa a sofrer interferência de outros tipos celulares como os linfócitos, macrófagos e monócitos, constituindo um processo complexo que envolve várias funções celulares coordenadas, reguladas por hormônios sistêmicos, e fatores locais como as citocinas: TNF- α , IL-6, IFN- γ , TGF- β , IL-4, IL-10, e pelos mediadores RANKL, RANK e OPG. Vários desses mediadores ativam os

osteoclastos que passam a expressar TRAP (enzima fosfatase ácida resistente ao tartarato), cuja principal função é a degradação da matriz óssea.

Apesar de diversos estudos constatarem reabsorções após o tratamento clareador endógeno, pouco se conhece sobre a relação causa-efeito nesse processo (Neuvald, 1997). Segundo alguns autores, esse tópico merece maiores estudos para que se elucide sua etiologia (Trope, 1997; Heithersay, 1999). Ademais, os produtos designados para a correção dos defeitos causados pela reabsorção também carecem de testes que determinem sua interação com o tecido ósseo.

O presente estudo procurou elucidar os aspectos imuno inflamatórios envolvidos na ocorrência da reabsorção cervical externa associada ao tratamento clareador endógeno, bem como o comportamento ósseo após o tratamento com agentes corretivos. Para tal, avaliou-se a ação do peróxido de hidrogênio, peróxido de carbamida e perborato de sódio sobre o tecido ósseo da calvária de camundongos, no que se refere à sua habilidade de induzir: TNF- α , IL-6, IFN- γ , IL-4, RANKL. Verificou-se ainda, nessa fase experimental, o número de células osteoclásticas TRAP positivas.

Adicionalmente avaliou-se a expressão de: TNF- α , IL-6, IFN- γ , TGF- β , IL-4, IL-10, RANKL, RANK e OPG, também, sobre o osso da calvária, tratada com MTA, Geristore[®] e Emdogain[®].

2. Revisão de Literatura

O escurecimento de dentes desvitalizados

As alterações de cor em dentes humanos variam de acordo com a sua etiologia, aparência, localização, severidade e interação com a estrutura dental. Podem ser classificadas em: extrínseca, intrínseca, ou combinadas (Hattab *et al.*, 1999). Independente do fator etiológico que leve a este problema, o escurecimento de um dente anterior, ou de um grupo de dentes, na maioria das vezes, interfere negativamente na aparência do sorriso, e a estética tem importante papel na odontologia moderna (Nishiyama *et al.*, 1989). A cor dos dentes é o fator isolado mais importante no equilíbrio estético do sorriso, por ser mais imediata e rapidamente percebida dentre as outras anomalias estéticas (Baratieri *et al.*, 2001).

A vitalidade pulpar cumpre um papel importante na manutenção da estética dentária, conservando o tom, matiz e a translucidez dos tecidos mineralizados. Quando essa vitalidade deixa de existir, pode ocorrer uma alteração brusca na cor e no brilho do dente, que fica geralmente com tons mais escuros, e matizes que podem variar entre o cinza, verde, pardo ou azulado (Busato *et al.* 2002).

Sabe-se também que dentes submetidos ao tratamento endodôntico podem sofrer mudanças em sua cor. As causas destas alterações podem ser: a abertura coronária insuficiente, o sangramento abundante ocorrido durante a

pulpectomia, a permanência de materiais obturadores na câmara pulpar, também o uso de materiais contendo prata precipitada ou iodofórmio (Nutting & Poe, 1963). O escurecimento dental pode ser consequência da degradação proteica sobre o material necrótico remanescente no interior dos túbulos dentinários e da hemólise dos eritrócitos que culmina na liberação de ferro e moléculas de coloração escura (Baratieri *et al.*, 2001).

Um acesso inadequado à câmara pulpar pode levar à retenção de materiais obturadores, medicamentos, sangue e restos de tecido pulpar em decomposição no seu teto, favorecendo o manchamento (Silveira & Berger, 1998; Busato *et al.* 2002).

Dahlstron (1993) observou que o sangue, proveniente das hemorragias pulpares, quando estagnado na câmara pulpar, sofre decomposição, e a combinação dos íons de ferro liberados com o sulfeto de hidrogênio produzido pelo metabolismo bacteriano resulta na formação de um composto negro, o sulfeto de ferro. Esse pigmento penetra nos canalículos dentinários, causando escurecimento dental.

Algumas substâncias como o nitrato de prata, as soluções contendo iodo (iodofórmio), o cloreto de mercúrio e outros sais metálicos, óleos presentes nas substâncias resinosas, quando em contato com outros medicamentos no interior do canal, também podem levar ao escurecimento dental (De Deus, 1986).

O tratamento endodôntico quando mal conduzido, apresentando um vedamento inadequado do canal, pode permitir a passagem de fluídos e detritos que escurecem os dentes (Zanin & Brugnera Jr., 2004).

A resolução desse problema nem sempre é fácil e simples, especialmente quando um dente anterior se apresenta mais escuro do que os demais. Obter uma estética adequada pode ser uma tarefa árdua, mesmo para um profissional habilidoso que utilize materiais e técnicas restauradoras de última geração (Baratieri *et al.*, 2001).

Para Frank (1982), o prognóstico do clareamento baseia-se no tipo e na causa das alterações de cor. As que tiveram como causa uma hemorragia pulpar ou a decomposição de restos teciduais apresentam um bom prognóstico. Entretanto, quando ocorre a penetração e precipitação de sais metálicos, medicamentos e cimentos contendo prata bem como materiais restauradores, a correção da cor torna-se mais difícil ou mesmo impossível.

A formação de cadeias longas e complexas no íntimo da estrutura dental é responsável pelo aumento do índice de absorção de luz pelo dente o que, em maior ou menor grau, resulta no seu escurecimento (Albers *et al.*, 1991; Baratieri *et al.*, 1993; Hattab *et al.*, 1999; Watts & Addy, 2001).

Agentes e técnicas de clareamento

Os agentes clareadores são veículos contendo radicais de oxigênio que, devido a sua instabilidade, quando em contato com os tecidos dentais, oxidam os pigmentos incorporados a ele. Esses macro-pigmentos são “fracionados” em cadeias moleculares cada vez menores, promovendo-se, ao final do processo, a despigmentação da estrutura dental (Albers *et al.*, 1991; Dzierzak, 1991; Fasanaro, 1992; Haywood, 1992; Baratieri *et al.*, 1993).

A preocupação com o clareamento de dentes desvitalizados não é recente. Bogue (1872) e Charple (1877) preconizavam a utilização do ácido oxálico como agente clareador, enquanto Truman (1881) indicava o uso do hipoclorito de cálcio. Harlan (1884) descreveu o que seria a primeira utilização do peróxido de hidrogênio no clareamento dental intracoronário. Kirk (1893) propôs o uso do peróxido de sódio (Na_2O_2) e Westlake (1895) do peróxido de hidrogênio associado ao éter.

Durante todo o século XX, diferentes técnicas e substâncias químicas foram utilizadas para o clareamento de dentes com alterações cromáticas, em especial os dentes desvitalizados. Em 1950, Pearson administrou calor e peróxido de hidrogênio para o clareamento de dentes não vitais (Sakaguchi & Hanpel, 1991). Cohen (1968) preconizou a utilização de bolinha de algodão embebida em peróxido de hidrogênio a 30%, ou superoxol. Em 1963, Nutting & Poe introduziram a técnica mediata, “walking bleach”, que utilizava peróxido de hidrogênio 30%-35% associado ao perborato de sódio ($2\text{NaBO}_2[\text{OH}]_2[\text{NH}_2\text{O}]$) para clareamento de dentes desvitalizados.

Anos mais tarde, Rotstein *et al.* (1993) e Weiger *et al.* (1993) preconizaram o uso isolado do perborato de sódio como agente clareador, pois, na presença de umidade, esse se decompõe em baixas concentrações de peróxido de hidrogênio e posteriormente em oxigênio ativo, que reage com o material orgânico iniciando o processo clareador.

O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) tem sido utilizado como agente clareador dental há mais de 100 anos (Burchard, 1898; Fisher, 1911; Hardman *et al.*, 1985), e ainda é o agente de escolha na maioria dos casos. É utilizado tanto em dentes vitais (técnicas convencional e caseira supervisionada), quanto

nos não vitais (técnica imediata ou mediata) (Leonard *et al.*, 1997; Li, 1997). Este, quando em contato com os tecidos, se degrada em oxigênio, responsável pelo clareamento, e água (Hardman *et al.*, 1985; Dzierzak, 1991; Baratieri *et al.*, 1993; Baratieri *et al.*, 2001).

Em 2004, Lim *et al.* comprovaram a eficácia do peróxido de carbamida 35% como clareador dental endógeno em dentes extraídos e corados artificialmente, apresentando resultados semelhantes aos obtidos com o peróxido de hidrogênio 35%.

O sucesso do tratamento relaciona-se diretamente à habilidade da substância clareadora em penetrar no interior dos túbulos dentinários e reagir com as moléculas escurecidas (Kirk, 1889; Saquy *et al.*, 1992).

Vários métodos foram propostos a fim de aumentar a eficiência e eficácia do tratamento clareador, baseados no aumento da permeabilidade do agente clareador pelos túbulos dentinários. Segundo Zaragoza (1984), Abbot, em 1918, introduziu um instrumento aquecido para acelerar a reação química, (Cohen & Burns, 1997). Pashley *et al.* (1981), Rotstein *et al.* (1991) e Saquy *et al.* (1992), também, recomendaram a associação do calor. Outros métodos foram propostos, como o condicionamento com ácido fosfórico da estrutura dentária antes da inserção do agente clareador para remoção da smear layer (Howell, 1980; Pashley *et al.*, 1983; Tittley *et al.*, 1988). A aplicação de ultrassom que fornece energia e conseqüente aceleração da quebra do produto também foi preconizada (Lacerda *et al.*, 1986).

Entretanto, a potencialização do agente clareador e aceleração do clareamento principalmente pela técnica termocatalítica tem sido questionada quanto a seus efeitos deletérios sobre a estrutura dental (Madison & Walton,

1990; Trope, 1997). Goldstein (1976) e Mondelli *et al.* (1984) observaram que a utilização de fontes de calor a fim de ativar os agentes clareadores podem lesar os tecidos dentários.

Apesar da viabilidade da execução, o tratamento clareador em dentes desvitalizados apresenta como risco a instalação de um processo de reabsorção radicular externa (Dotto *et al.*,2000).

Reabsorção cervical externa e o clareamento endógeno

A reabsorção radicular cervical é uma destruição progressiva de origem inflamatória, que ocorre imediatamente abaixo da inserção epitelial do dente, que pode ou não coincidir com a área cervical do mesmo (Andreasen, 1981; Makkes & Thoden, 1975). Ela pode ocorrer como uma reação retardada após uma agressão e, até o momento, sua etiopatogenia não é inteiramente compreendida.

O cemento é o tecido que sobrepõe e protege a dentina radicular. Em algumas situações provocadas ou de natural deficiência, essa dentina fica exposta à ação reabsortiva dos osteoclastos (Gold & Hasselgren,1992; Hammarström & Lindskog, 1992). Diversos fatores etiológicos relacionam-se à ocorrência de danos na região cervical do dente. Dentre eles incluem-se o trauma dental, o tratamento ortodôntico, a terapia periodontal, o clareamento intracoronário e a ocorrência por causa idiopática (Patel *et al.*, 2009; Heithersay 1999).

A infiltração dos agentes clareadores nos túbulos dentinários, atingindo o periodonto, pode induzir uma resposta inflamatória, e consequente reabsorção

cementária e dentinária na área cervical (Paiva & Antoniazzi, 1988; Teixeira *et al.*, 2000; Loguercio *et al.*, 2002). Esse risco é maior à medida que se aumenta a permeabilidade do agente clareador e sua penetração nos túbulos dentinários (Rotstein *et al.*, 1991; Pécora *et al.*, 1991; Dahlstron, 1993; Zalkind *et al.*, 1996).

Harrington & Natkin, (1979), foram os primeiros autores a sugerirem que os dentes despulpados, submetidos ao clareamento, poderiam apresentar reabsorção cervical externa alguns anos após o tratamento associado à utilização de uma fonte de calor ou ao trauma dental prévio.

Um dos fatores que pode contribuir para ocorrência da reabsorção cervical externa após o clareamento dental é o tipo de junção cimento–esmalte presente no elemento dental relacionado. Essa relação pode determinar diretamente o maior ou menor extravasamento do material clareador para o tecido periodontal cervical adjacente. A junção tipo “gap” (dentina exposta), segundo Koulaouzidou *et al.* (1996), apresenta mais permeabilidade, permitindo maior extravasamento cervical dos agentes clareadores.

Segundo Demarco & Garone Netto (1995) e Lado *et al.* (1983), a penetração do peróxido de hidrogênio no periodonto, através dos túbulos dentinários e das falhas amelo-cementárias (presentes em aproximadamente 10% dos dentes), seria a causa principal da reabsorção externa pós clareamento. O extravasamento do peróxido de hidrogênio, no nível cervical, causa a queda brusca de pH na região, culminando com a desnaturação da dentina, desconhecida pelo sistema imune, sendo então, reabsorvida pelos osteoclastos.

Muitos estudos procuram demonstrar essa premissa. Em um estudo laboratorial no qual foram realizadas leituras do pH na região da junção amelo-

cementária durante o clareamento, Kehoe (1987) verificou a existência de uma leve acidez após a aplicação do agente clareador, o que induziria a atividade osteoclástica na região.

De acordo com Rotstein (2000), os mecanismos pelos quais o clareamento dental induz danos ao ligamento periodontal e/ou ao cimento ainda não foram completamente elucidados. Presumivelmente, os irritantes químicos se difundem através dos túbulos dentinários e dos defeitos presentes na junção amelo-cementária, causando necrose tecidual, inflamação do ligamento periodontal e, finalmente, reabsorção radicular. Pires (2003) sugere que um pH ácido, muitas vezes presente nos sítios submetidos ao clareamento, é uma condição ideal para a ocorrência da reabsorção radicular, intermediada por hidrolases ácidas que levam a desmineralização dos tecidos.

A possibilidade de degradação química dos tecidos que entram em contato com o agente clareador não deve ser descartada. Além da possibilidade de desencadeamento de uma reabsorção mediada imunologicamente, esses agentes podem levar a formação de radicais tóxicos entre o peróxido de hidrogênio e a dentina ou o cimento, que funcionariam como agentes irritantes (Demarco & Garone Netto, 1995).

Tecido ósseo e mediadores da reabsorção

O osso é um tecido dinâmico que passa por constante remodelação com episódios de formação e reabsorção óssea ao longo da vida. O desequilíbrio entre esses dois fenômenos pode determinar diversas condições patológicas (Roodman, 1996). Os dois tipos celulares responsáveis pela remodelação

óssea são os osteoblastos, engajados na formação e os osteoclastos, com função de reabsorção óssea (Roodman, 1996; Suda *et al.*, 1999).

Os osteoclastos são responsáveis pela reabsorção óssea e de outros tecidos duros, inclusive a raiz dos dentes (Hammarström & Lindskog, 1985).

Fonseca & Bahia (1995) descrevem os osteoclastos como as principais células envolvidas no processo de reabsorção cervical, pós-clareamento dental endógeno. Os osteoclastos, células primárias responsáveis pela reabsorção óssea, são diferenciadas das células progenitoras hematopoiéticas, sob a influência de vários hormônios, citocinas e fatores de diferenciação. Uma vez completamente diferenciados, os osteoclastos rapidamente morrem na ausência de algum fator de sobrevivência (Lee *et al.*, 2004).

Semelhantemente aos osteoclastos, os odontoclastos são células clásticas cuja função relaciona-se a quadros patológicos que incluem anomalias craniofaciais, erupção dental e reabsorção radicular (Wang & McCauley, 2010). São células que se diferenciam de progenitores celulares circulantes, oriundos da polpa dental e ligamento periodontal (Sahara *et al.*, 1996). Essas compartilham de características dos osteoclastos como catepsinas K e D TRAP (fosfatase ácida resistente ao tartarato) e metaloproteinases (MMP-9) (Gotz *et al.*, 2000). Portanto, a reabsorção dental é determinada pela odontoclasto/osteoclastogênese, e é regulada por um processo imune fisiológico (Wang & McCauley, 2010).

Os osteoclastos originam-se de células hematopoiéticas precursoras da linhagem de monócitos/macrófagos (Teitelbaum, 2000). Interações entre o estroma celular dos osteoblastos e das células progenitoras de osteoclastos conduzem para a indução e diferenciação dos osteoclastos, bem como ativação

dos mesmos (Suda *et al.*, 1999). O fator de estimulação de colônias e macrófagos (M-CSF) e o ligante do receptor ativador do NF κ -B (RANKL) desempenham importante papel na osteoclastogênese (Hill *et al.*, 1998; Lerner, 2000). RANKL é uma proteína disponível na forma transmembrana e solúvel, ambas produzidas principalmente no estroma celular dos osteoblastos (Hofbauer *et al.*, 2000; Teitelbaum, 2000; Teitelbaum & Ross, 2003). Anteriormente eram proteínas consideradas linfócito T específicas, mas outras células como as da medula, endoteliais e condrócitos, demonstraram expressá-la (Wong *et al.*, 1997; Lacey *et al.*, 1998). Agem por ligação com o receptor para RANKL (RANK) nas células progenitoras de osteoclastos, determinando a diferenciação e ativação desses (Hofbauer *et al.*, 2000; Lerner, 2000). Segundo Kong *et al.*, em 1999a, os camundongos deficientes em RANKL, por deleção do gene, não possuem osteoclastos e desenvolvem osteopetrose. O sistema RANKL/RANK é essencial para a formação de osteoclastos. O RANKL é também expressado em abundância por ativação dos linfócitos T; essas células podem de fato desencadear a osteoclastogênese, e esse mecanismo é provavelmente essencial na destruição das articulações, comum na artrite reumatóide (Kong *et al.*, 1999b). A formação e ativação dos osteoclastos, nessas patologias, é regulada direta e indiretamente pelas células T CD4⁺ infiltradas nas lesões (Sato & Takayanagi, 2006). Os efeitos indiretos são, na maioria, mediados por citocinas inflamatórias, como TNF- α , IL-6 e IL-1, produzidas pelas células sinoviais como macrófagos, que induzem a expressão de RANKL nos fibroblastos sinoviais (Hofbauer *et al.*, 1999; Takayanagi, *et al.* 2000). Nenhuma destruição óssea não inflamatória, entretanto, pode ser atribuída às células Th1. Essa é uma questão importante para determinar qual

tipo de célula T está associada à osteoclastogênese em condições sub-inflamatórias. Para regular a osteoclastogênese e seus efeitos, a OPG (osteoprotegerina) age como um receptor decoy, competindo com RANK pela ligação com RANKL. As variações dos níveis de RANKL/OPG controlam a osteoclastogênese *in vivo* e *in vitro* (Boyle *et al.*, 2003; Teitelbaum *et al.*, 2003).

Diversos estudos que investigam a osteoclastogênese associada à resposta imune inflamatória demonstram a existência de destruição óssea mediada por citocinas. Citocinas como TNF- α , IL-6, TGF- β , IL-1, IL-7, IL-17, induzem a osteoclastogênese e a atividade de reabsorção óssea (Maruotti *et al.*, 2012). Em contrapartida, citocinas como IL-4, IL-10, IL-12, IFN- γ desempenham o efeito contrário, inibindo a diferenciação dos osteoclastos e de sua atividade (Kohara *et al.*, 2011).

O TNF- α é uma citocina pró-inflamatória multifuncional, que possui numerosas funções e é produzido principalmente por monócitos e macrófagos ativado. É um dos principais mediadores da resposta do hospedeiro, mediada pelos macrófagos em resposta à toxinas bacterianas, produtos inflamatórios e outros estímulos invasores (Tracey & Cerami, 1993). É importante no recrutamento de osteoclastos, demonstrando papel central em doenças que apresentam reabsorção óssea, como na artrite reumatóide (Wong *et al.*, 2009). Demonstrou-se que a inibição de TNF- α é efetiva no tratamento de doenças reumáticas (Kohara *et al.*, 2011.). Definido como um potente fator de reabsorção óssea, TNF- α é responsável por estimular essa reabsorção *in vitro* (Thomson *et al.*, 1987) e *in vivo* (König *et al.*, 1988). O envolvimento do TNF- α tem sido associado à perda óssea periodontal, à perda de implantes ortopédicos e a outras formas de inflamações osteolíticas crônicas (Bingham,

2002). Essa citocina também pode ser produzida pelos osteoblastos, atua na osteoclastogênese pela ativação de NF- κ B dentro de um mecanismo intracelular, ou pode atuar de maneira autócrina como mediador da estimulação de RANKL (Zou *et al.*, 2001). Os osteoclastos induzidos por TNF- α na presença de IL-1 demonstraram capacidade de causar cavidades de reabsorção em lascas de dentina. Ambas citocinas possuem importante papel na reabsorção óssea, desencadeada em patologias inflamatórias (Kobayashi *et al.*, 2000). Apesar de seu comprovado papel na osteoclastogênese, um recente estudo realizado por Maruotti *et al.* em 2012, questionando o papel de inibidores de TNF- α no tratamento de artrites crônicas, demonstrou indícios de que outros mediadores seriam importantes na ativação da reabsorção óssea nessas patologias. Portanto, apenas a terapia baseada na inibição dessa via não seria suficiente.

Como o TNF- α , a IL-6 é conhecida também por seu papel na osteoclastogênese e na reabsorção óssea (Kotake *et al.*, 1996). Os efeitos da IL-6 são interconectados com os da IL-1 e TNF- α . Ela age estimulando a diferenciação do progenitor mesenquimal da linhagem osteoblástica (Taguchi *et al.*, 1998), além de ser potente agente anti-apoptótico para essas células. A principal fonte de IL-6 no tecido ósseo é o estroma celular dos osteoblastos e não o dos próprios osteoclastos (Holt *et al.*, 1996).

A semelhança de outros mediadores de reabsorção, a IL-6 estimula a atividade osteoclástica e a reabsorção óssea por meios indiretos, aumentando as interações entre osteoblastos e osteoclastos. Essa citocina, na verdade, estimula a atividade osteoclástica quando associada, em cultura, com osteoblastos, mas não se verificou atividade de estimulação em cultura pura de

osteoclastos (Hattersley *et al.*, 1988). De forma semelhante, embora os precursores dos osteoclastos expressem níveis muito mais elevados de receptores para IL-6 do que os osteoblastos, estudos indicam que receptores nos osteoblastos, e não nos osteoclastos, são necessários para que IL-6 induza a diferenciação osteoclástica (Udagawa *et al.*, 1995). A primeira ação da IL-6 é, portanto, estimular os osteoblastos na produção dos efeitos em cascata que ativam os osteoclastos entre os quais está RANKL. Os efeitos produzidos, portanto, podem atuar de modo parácrino, para ativar diretamente a atividade osteoclástica ou de modo autócrino para promover a estimulação de osteoblastos na produção de fatores parácrinos que imediatamente ativem os osteoclastos (Steeve *et al.*, 2004).

TNF- α , IL-1 e IL-6 são citocinas pró-inflamatórias, que estimulam a osteoclastogênese de forma sinérgica (Ragab *et al.*, 2002), aumentando a produção de RANKL e OPG. A ação dominante dessas citocinas resulta no direto aumento da atividade de RANKL. Juntas, essas três citocinas regulam sua própria expressão, podendo agir não apenas por ação sobre o estroma celular, mas também diretamente sobre os osteoclastos e seus precursores. *In vivo*, os níveis de osteoclastogênese são modulados rapidamente, de acordo com a soma de sinais inibitórios e de ativação (Steeve *et al.*, 2004). Lam *et al.*, 2001, demonstraram que TNF- α age diretamente nos precursores de osteoclastos, potenciando a osteoclastogênese induzida por RANKL, mesmo quando em níveis baixos. Sinergisticamente TNF- α e RANKL regulam o aumento da expressão de RANK em animais selvagens. TNF- α também estimula a produção de IL-6 pelos osteoclastos e osteoblastos pela ativação de p38MAPK, que aumenta a transcrição do fator NF-kappa B (Kurokouchi *et al.*,

1998). Diversos estudos, entretanto, demonstraram que a TNF- α isolada e diretamente não foi capaz de induzir a reabsorção óssea pelos osteoclastos (Thomson *et al.*, 1987; Azuma *et al.*, 2000; Komine *et al.*, 2001).

Osteoclastos maduros e ativados expressam altos níveis de TRAP (fosfatase ácida resistente ao tartarato), uma das principais substâncias com função de degradar matriz óssea mineralizada. Diversos estudos demonstram que camundongos com depleção do gene TRAP específico, desenvolvem menos reabsorção óssea e podem apresentar osteopetrose (Perez-Amódio *et al.*, 2006). Desde que foi demonstrado que a enzima fosfatase ácida expressada pelos osteoclastos resistia à inibição pelo tartarato (Hammarström *et al.*, 1971), TRAP foi sendo amplamente utilizada nos teste de marcação celular para identificar osteoclastos e seus precursores ativados (Schindelmeiser *et al.*, 1989).

Um importante mediador da osteoclastogênese, que apresenta um papel de certa forma ambíguo, é o TGF- β . Esta citocina é secretada por linfócitos T ativados, T regulatórios e monócitos estimulados por antígenos (Hahn & Liewer, 2007). Quando ocorre a reabsorção da matriz óssea, a alta presença de TGF- β estimula a proliferação dos osteoblastos e a reposição de matriz óssea (Martin & Sims, 2005). TGF- β controla o início e a resolução das respostas inflamatórias, regulando a quimiotaxia, ativação e sobrevivência de células imunocompetentes como os linfócitos, macrófagos e granulócitos (Li *et al.*, 2006). Diversos estudos comprovam que esse mediador promove a osteoclastogênese induzida por RANKL, via ativação do complexo TRAF6 (Yasui *et al.*, 2011). Recentemente constatou-se que o TGF- β propicia a osteoclastogênese, inibindo mediadores inflamatórios como IFN- γ e IL-10, que

essencialmente combatem a formação dos osteoclastos. Entretanto essa mesma citocina suprime a osteoclastogênese, reduzindo a liberação de RANKL pelos osteoblastos (Fox & Lovibond, 2005).

Para combater e/ou equilibrar a resposta pró-inflamatória e ósseo reabsortiva, outros mediadores como a IL-4, IL-10, IFN- γ e OPG são expressados em momentos oportunos. A OPG é uma proteína membro da família do receptor de TNF- α expressa pelos osteoblastos, que inibe fortemente a reabsorção óssea, ligando-se com RANKL, o que impede a ligação no seu respectivo receptor (RANK) e a consequente ativação da dos osteoclastos. A IL-4 é uma

citocina que, juntamente com a OPG, bloqueia o sistema RANK/RANKL, inibindo a inflamação e a osteoclastogênese (Wei *et al.*, 2002; Bessis *et al.*, 1998). É altamente detectada em doenças como a artrite reumatoide sinovial, em que inibe a expressão de TNF- α , IL-1 (Miossec *et al.*, 1992), IL-6 e prostaglandina E₂ (PGE₂) (Sugiyama *et al.*, 1995). IL-4 não só inibe alguns mediadores pró-inflamatórios, mas também regula a expressão de mediadores anti-inflamatórios, como os do receptor antagonista de IL-1, o que revela suas habilidades anti-inflamatórias (Allen *et al.*, 1993). Também a IL-4 reduz a reabsorção óssea (Miossec *et al.*, 1994). Em sinoviócitos reumatóides diminui a produção de IL-6, potente ativador de osteoclastogênese (Sugiyama *et al.*, 1995).

Outro mediador importante no combate à reabsorção óssea é o IFN- γ , secretado pelas células T helper tipo 1, células T citotóxicas, células dendríticas, células natural killer (NK) e contribui principalmente para a regulação da resposta imune mediada pelos linfócitos T (Dunn *et al.*, 2006).

IFN- γ também estimula macrófagos a produzir óxido nítrico (NO) e a apresentar antígenos, constituindo um importante mecanismo de defesa contra vírus e bactérias (Billiau *et al.*, 1998). Age sobre o metabolismo ósseo inibindo a sinalização de RANKL pela degradação de TRAF6, o que resulta na supressão da osteoclastogênese (Takayanagi *et al.*, 2000; Gohda *et al.*, 2005). Vermeire *et al.* (1997) demonstraram que camundongos deficientes de IFN- γ desenvolvem mais reabsorção óssea num quadro de artrite induzida. Entretanto, tal achado não exclui o fato de que IFN- γ desenvolve funções múltiplas na regulação de patologias ósseas. Em alguns momentos agudos da resposta imune observou-se que essa molécula indiretamente estimularia a formação de osteoclastos via ativação de células Th1 (Gao *et al.*, 2007). Pode também induzir a expressão de M-CSF por células do estroma da medula óssea e dessa forma estimular a proliferação de precursores osteoclásticos (Lacey *et al.*, 1995).

Experimentos comprovam que as células T, que por hora expressam citocinas inflamatórias como TNF- α e IL-1, indutores de RANKL, podem também expressar citocinas que inibem RANKL, como IL-4, IL-10 e IFN- γ (Takayanagi *et al.*, 2005).

A interleucina 10 (IL-10), também é uma citocina regulatória do processo inflamatório (Hahn e Liewer, 2007), que inibe as funções de macrófagos e células dendríticas e a ativação dos osteoclastos, como se demonstrou em lesões periapicais (Stashenko *et al.*, 1998; Kawashima & Stashenko., 1999). Tal mediador relaciona-se à síntese de colágeno e proliferação celular, mediando a polarização dos macrófagos para o subtipo 2 (de Oliveira Mendes *et al.*, 2003; Rezende *et al.*, 2007). IL-10 inibe a osteoclastogênese RANK

induzida e também a cascata de sinalização de cálcio por RANK, ambos pela inibição da transcrição de TREM-2. Esse mecanismo diminui a ativação de RANKL, o que constitui uma das principais vias regulatórias da osteoclastogênese (Park-Min *et al.*, 2009).

Reparo das reabsorções radiculares

Com a reabsorção cervical instalada é necessário instituir uma terapia adequada para a manutenção do elemento dental. A melhor terapêutica deve ser precedida de um correto diagnóstico da alteração inflamatória, utilizando-se exame radiográfico convencional ou mesmo tomografias computadorizadas, a fim de se mensurar a extensão da lesão (Patel & Dawood, 2007).

O tratamento poderá ser: a exodontia, a extrusão (a fim de se expor a lesão para fora dos limites ósseos) (Fuss *et al.*, 2003) ou a reimplantação do elemento (após curetagem do alvéolo), nos casos mais graves (Andreasen & Hjorting-Hansen, 1966). Procura-se também recuperar o defeito preenchendo-o com materiais restauradores definitivos, após curetagem dos tecidos acometidos pelo processo inflamatório (Al-Sabek *et al.*, 2005; Fuss *et al.*, 2003). A regeneração tecidual guiada é um procedimento cirúrgico periodontal que, através do levantamento de um retalho mucoperiosteal, permite a exposição da superfície radicular, expondo o local da reabsorção, para a limpeza e restauração do defeito radicular. Esse procedimento permite a cicatrização do tecido ósseo adjacente (Karring *et al.*, 1984; Nyman *et al.*, 1987; Fuss *et al.*, 2003; Yilmaz *et al.*, 2010).

Diversos materiais são propostos para o selamento dessas cavidades, esperando-se que sejam bem tolerados pelos tecidos periodontais (Al-Sabek *et al.*, 2005; Mehrvarzfar *et al.*, 2010). Dentre esses, o Geristore[®] é um restaurador híbrido, resinoso e ionomérico, cuja utilização em preenchimentos radiculares subgengivais é bem indicada. É usado em reparos cirúrgicos de perfurações radiculares, como guia de regeneração tecidual (Abitbol *et al.*, 1995, 1996; Resillez-Urioste *et al.*, 1998; Behnia *et al.*, 2000). Analisando sua sensibilidade à umidade, Cho *et al.* (1995) verificaram que o Geristore[®] apresentou índices menores que os cimentos convencionais de Ionômero de vidro. Estevez *et al.* (2010) em um estudo clínico de casos de reabsorção cervical em incisivos centrais superiores tratados com Geristore[®] obtiveram 77,8% de sucesso, após 12 meses de acompanhamento.

Outro cimento restaurador indicado na terapêutica desses casos é o MTA (agregado de trióxido mineral), que possui diversas propriedades favoráveis incluindo bom selamento, biocompatibilidade, efeito bactericida, radiopacidade, habilidade de presa na presença de sangue. É indicado para o capeamento pulpar, a obturação endodôntica, reparos radiculares em condições cirúrgicas ou não, também nas perfurações de furca (Torabinejad & Chivian, 1999; Barbosa Silva *et al.*, 2008; Rezende *et al.*, 2008; Mehrvarzfar *et al.*, 2010; Torabinejad & Parirokh, 2010). Dentes perfurados e tratados com MTA apresentam camadas teciduais não inflamatórias e menor infiltração quando comparados aos com o amálgama dental, materiais restauradores intermediários a base de óxido de zinco e eugenol e o Super EBA (Torabinejad *et al.*, 1995; Bargholz, 2005). Quanto ao selamento marginal, Mehrvarzfar *et al.* (2010) observaram valores similares, em dentes com perfuração de furca

tratados com o MTA e o Geristore[®], que apresentaram comportamento superior ao do amálgama.

A amelogenina também vem sendo indicada quando procura-se paralisar e promover o reparo de reabsorções invasivas, podendo associar-se a outros materiais restauradores como os descritos anteriormente (Behnia *et al.*, 2000; Filippi *et al.*, 2002) A amelogenina, o principal constituinte da matrix do esmalte, é secretada pelos ameloblastos, tendo importante papel em sua formação (Termine *et al.*, 1980). Estudos anteriores demonstraram que a amelogenina também é expressa no tecido periodontal (Fong & Hammärstrom, 2000). De maneira interessante foi observada uma reabsorção radicular significativa em camundongos geneticamente deficientes para a amelogenina, sugerindo que essa proteína regula negativamente a reabsorção radicular odontoclástica (Hatakeyama *et al.*, 2003). Além disso, a aplicação de Emdogain[®], fonte conhecida de amelogenina, largamente utilizado na reparação periodontal, inibe a reabsorção em modelos de estudo animal e humano (Hamamoto *et al.*, 2002; Barret *et al.*, 2005; Yagi *et al.*, 2009). Tem-se demonstrado que a amelogenina suprime, em culturas de osteoclastos, a formação e a expressão de RANKL (Hatakeyama *et al.*, 2006; Nishiguchi *et al.*, 2007). Alguns estudos comprovam que a utilização de amelogenina, no reimplante de dentes avulsionados ou em processo de anquilose, reduz o nível de reabsorção perirradicular e controla a evolução da anquilose (Filippi *et al.*, 2002; Wiegand & Attin, 2008). Apesar de serem necessários mais estudos, todos esses achados reforçam a hipótese de que o tratamento com amelogenina pode prevenir a reabsorção óssea/radicular e o número de odontoclastos, *in vivo* (Yagi *et al.*, 2009).

3. Objetivos

3.1 Objetivo Geral:

Este estudo avaliou os efeitos dos produtos clareadores dentais, peróxido de carbamida 37 % e perborato de sódio P.A., bem como dos agentes reparadores MTA, Geristore[®] e Emdogain[®] sobre a ativação das células ósseas e do metabolismo deste tecido. Esta pesquisa permitiu que se compreendessem parcialmente os mecanismos imunológicos envolvidos nas reabsorções cervicais externas induzidas pelo clareamento endógeno, bem como o comportamento do tecido ósseo a agentes utilizados no tratamento dessas reabsorções.

3.2 Objetivos específicos:

3.2.1 Avaliar, por PCR em tempo real, a expressão de TNF- α , IL-6, IFN- γ , IL-4, RANKL pelas células ósseas, *ex vivo*, na presença dos agentes clareadores, peróxido de carbamida 37% e perborato de sódio P.A.

3.2.2 Avaliar, por marcação histoquímica para TRAP (fosfatase ácida resistente ao tartarato), a ativação de osteoclastos, na presença dos agentes clareadores, peróxido de carbamida 37% e perborato de sódio P.A.

3.2.3 Avaliar, por PCR em tempo real, a expressão de TNF- α , IL-6, IFN- γ , IL-4, IL-10, TGF- β , RANKL, RANK e OPG, pelas células ósseas, *ex vivo*, na presença dos agentes de reparação MTA, Geristore[®] e Emdogain[®].

4. Metodologia

4.1 Caracterização do projeto:

Este foi um estudo experimental que avaliou o efeito do peróxido de carbamida 37 % e perborato de sódio P.A. sobre o tecido ósseo da calvária de camundongos, *ex vivo*, no que diz respeito à produção de TNF- α , IL-6, IFN- γ , IL-4, RANKL, por PCR em tempo real; bem como, sobre a ativação das células osteoclásticas, através da marcação histoquímica para TRAP (Fosfatase ácida tartarato resistente). Adicionalmente este estudo avaliou também por PCR em tempo real a expressão, *ex vivo*, de TNF- α , IL-6, IFN- γ , TGF- β , IL-4, IL-10, RANKL, RANK e OPG, pelo osso da calvária de camundongos onde foram realizadas “feridas” ósseas e estas imediatamente foram tratadas com MTA, Geristore[®] e Emdogain[®].

4.2 Plano amostral

Utilizaram-se camundongos C57BL/6 para realizar ensaios em suas calvárias, com a injeção de agentes clareadores e tratamento com reparadores utilizados no clareamento dental e no tratamento das reabsorções cervicais externas, respectivamente. Os animais foram sacrificados em dois momentos distintos, 7 e 14 dias (para os agentes clareadores) e 14 e 21 dias (para as

substâncias reparadoras), quando as calotas cranianas foram removidas, maceradas, o RNA extraído e, posteriormente, a expressão gênica das citocinas foi detectada por PCR em tempo real. Nos animais em que se inocularam os agentes clareadores, avaliou-se também a ativação de osteoclastos pelo teste histológico para TRAP.

O estudo foi composto pelos seguintes grupos:

Agentes clareadores:

- ✓ Grupo I - 7 dias (grupo controle negativo - H₂O estéril);
- ✓ Grupo II - 7 dias (Peróxido de hidrogênio 20 Volumes - H₂O₂ 20V);
- ✓ Grupo III - 7 dias (Peróxido de carbamida 37% - PC);
- ✓ Grupo IV - 7 dias (Perborato de Sódio P.A + Peróxido de hidrogênio 20 Volumes – PS + H₂O₂ 20V)
- ✓ Grupo V -14 dias (grupo controle negativo - H₂O estéril);
- ✓ Grupo VI – 14 dias (Peróxido de hidrogênio 20 Volumes - H₂O₂ 20V);
- ✓ Grupo VII – 14 dias (Peróxido de carbamida 37% - PC);
- ✓ Grupo VIII – 14 dias (Perborato de Sódio P.A + Peróxido de hidrogênio 20 Volumes – PS + H₂O₂ 20V)

Agentes reparadores:

- ✓ Grupo A -14 dias (grupo controle negativo – frasco eppendorf cortado vazio);
- ✓ Grupo B – 14 dias (MTA)

- ✓ Grupo C – 14 dias (Geristore[®])
- ✓ Grupo D – 14 dias (Emdogain[®])
- ✓ Grupo E -21 dias (grupo controle negativo – frasco eppendorf cortado vazio);
- ✓ Grupo F – 21 dias (MTA)
- ✓ Grupo G – 21 dias (Geristore[®])
- ✓ Grupo H – 21 dias (Emdogain[®])

4.3 Fármacos utilizados

Utilizou-se o Peróxido de Carbamida 37 % (FGM, Joinvile, SC, Brasil), o perborato de sódio P.A. (Lenza Farmacêutica, Belo Horizonte, MG, Brasil), o peróxido de hidrogênio numa concentração de 20 Volumes (Lenza Farmacêutica, Belo Horizonte, MG, Brasil). O perborato de sódio foi manipulado com peróxido de hidrogênio 20 Volumes (1:1) a fim de formar-se uma pasta injetável. O Peróxido de Hidrogênio [20 V] foi testado individualmente para avaliar seus efeitos sobre o metabolismo ósseo, uma vez que foi utilizado como solvente do perborato de sódio. A água destilada estéril foi utilizada como controle negativo.

Foram utilizados também o cimento MTA Bios[®] (Ângelus, Londrina, PR, Brasil), o restaurador Geristore[®] (Den-Mat Corporation, Santa Maria, CA) e Emdogain[®] (Straumann, Suíça), todos manipulados de acordo com as instruções dos respectivos fabricantes em condições de esterilidade.

4.4 Animais

Utilizaram-se camundongos C57BL/6 com idade entre 8 e 10 semanas adquiridos do CEBIO (Centro de Bioterismo da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil). Esses animais foram mantidos em biotério com barreiras, controle dos ciclos de luz, comida e água *ad libitum*. Cada grupo foi constituído por cinco animais para os experimentos com agentes clareadores e sete animais para os experimentos com os agentes reparadores, totalizando-se 136 camundongos. O protocolo desse experimento foi autorizado pelo comitê de ética e pesquisa em animais (CETEA – UFMG, protocolo nº178/2007).

4.5 Anestesia

Todos os animais estiveram sob anestesia geral durante os procedimentos operatórios. Por via intraperitoneal preparou-se uma solução contendo 60mg/kg de hidrocloreto de ketamina (Dopalen, Vetbrands- Divisão de Saúde Animal, Jacareí, SP, Brasil) e 20mg/kg de xilazina (Anasedan, Agribands do Brasil Ltda., Paulínia, SP, Brasil). Desta solução foi administrado um volume de 1-1,5µL/g de peso corpóreo do animal.

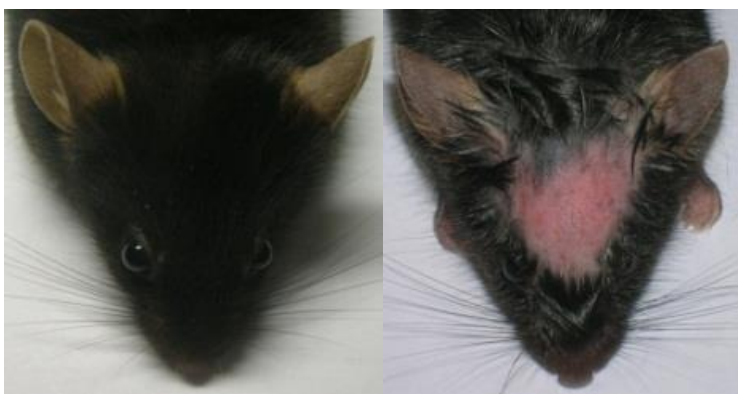


Fig. 01- Anestesia intraperitoneal

4.6 Procedimentos cirúrgicos utilizados na inoculação dos Agentes Clareadores

Os camundongos tiveram suas cabeças raspadas na área situada entre a linha dos olhos e das orelhas (vide figura 02), utilizando-se lâminas de aço inoxidável (Gillete-Procter e Gamble do Brasil, Campo Alegre-RJ, Brasil). Em seguida 40 µl dos agentes em teste foram injetados no centro da área despelada, abaixo da pele, rompendo-se o periósteo da calvária. Utilizou-se nesta etapa seringas de 1,0 ml com agulhas de 0,38 X 13 / 27,5 G (BD PlastipaK, São Paulo, SP, Brasil).

No 7º e 14º dias após as inoculações os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e, imediatamente após, a região submetida ao tratamento foi dissecada. Utilizando-se fresa nº ¼ (KG-Sorensen, Barueri, SP, Brasil) acoplados em peça de mão e motor elétrico (Driller, São Paulo, SP, Brazil) extraiu-se as áreas de osso da calvária, tendo a mesma uma área média de 4 X 5 mm (vide figura 02). Partes das peças cirúrgicas foram armazenadas em solução de Trizol (GIBCO BRL Laboratories, Grand Island, N. Y., EUA) ou fixadas em solução de formalina 10 % (Merck, Darmstadt, Germany).



(A)

(B)

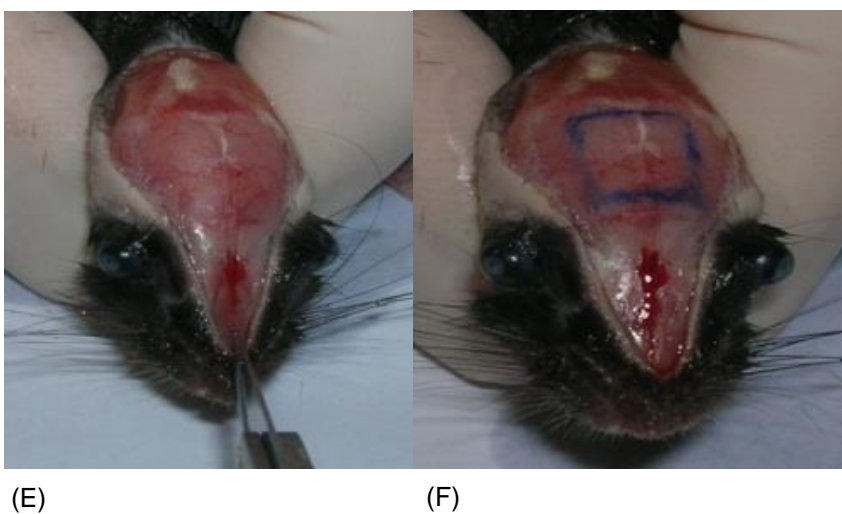
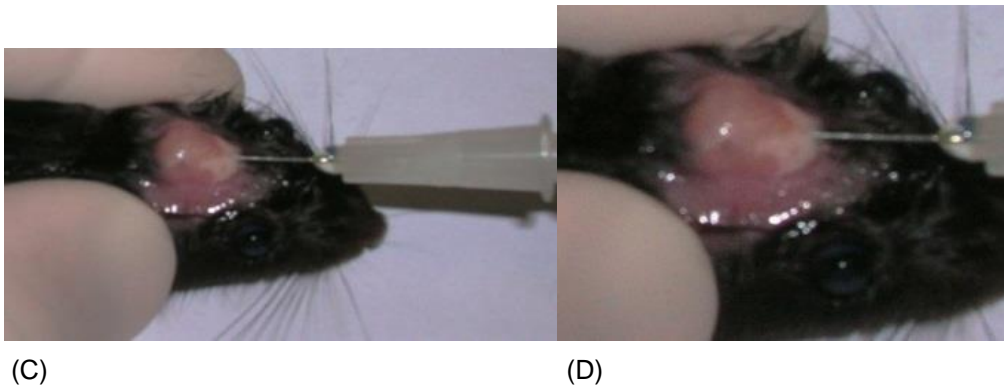


Fig. 02- (A-D) Acima seqüência de preparo da calvária até inoculação dos agentes clareadores. (E-F) Abaixo dissecação e demarcação da área de extração.

4.7 Procedimentos cirúrgicos utilizados na experimentação dos Agentes reparadores.

A cabeça do camundongo foi incisada em sua linha média utilizando-se lâminas de bisturi estéril (Solidor[®], São Paulo, SP, Brasil). Em seguida, com uma ponta adiamantada esférica nº 8 (KG-Sorensen, Barueri, SP, Brasil) acoplados em peça de mão e motor elétrico (Driller, São Paulo, SP, Brazil) provocou-se uma “ferida”, rompendo-se o periósteo e a cortical superficial da calvária. Posteriormente cada agente reparador foi inserido em frascos eppendorf (0,5 ml) seccionados a dois milímetros de sua extremidade inferior,

(vide figura 03), e colocados sobre a ferida óssea. Este procedimento permitiu que se padronizasse a área de contato do material com o tecido ósseo, além de impedir o deslocamento dos materiais. Suturou-se os tecidos moles utilizando-se fio de mononylon agulhado nº 6-0 (Ethicon – Johnson & Johnson, São José dos Campos, SP, Brasil).

Ao final de 14 e 21 dias, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e a região tratada foi dissecada. Utilizando-se fresa nº ¼ (KG-Sorensen, Barueri, SP, Brasil) acoplados em peça de mão e motor elétrico (Driller, São Paulo, SP, Brazil) extraiu-se as áreas de osso da calvária expostas (vide figura 04) aos agentes em teste e as armazenou em solução de Trizol (GIBCO BRL Laboratories, Grand Island, N. Y., EUA).



(A)

(B)



(C)

(D)



(E)

Fig. 03- (A) Dissecação da cabeça; (B) “Ferida” óssea provocada; (C) Agente reparador sendo colocado na ponta do frasco eppendorf; (D) Posicionamento sobre a “ferida”; (E) Sutura realizada.



(A)



(B)



(C)

Fig. 04- (A) Vista pós-cicatrização; (B) Abertura pós-cicatrização; (C) Extração do osso exposto ao agente.

4.8 Procedimentos para análise de PCR em Tempo Real

Extração do RNA

As amostras armazenadas em Trizol foram trituradas em aparelho elétrico (IKA T10 basic – Merse – SP, Brasil) e, sequentemente, foi adicionado 200µL de clorofórmio. Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 15 minutos a 12,000 x g a 4°C. A fase aquosa foi transferida para outro eppendorf, adicionando-se 250 µL de isopropanol (Merck, São Paulo). A mistura foi incubada na estufa BOD (Q-315D, Quimis®) a 25°C, por 15 minutos e centrifugada por 10 minutos a 12,000 x g a 4°C promovendo-se a precipitação do RNA. O sobrenadante foi descartado e com 250µL de etanol 75% lavou-se do RNA precipitado. Para se obter o pelet, vortexou-se e centrifugou-se o eppendorf a 10,000 x g a 4°C por 15 minutos. Descartou-se o sobrenadante e emborcando-se os eppendorfs por 15 minutos em média para o escoamento de todo o líquido. Em seguida, adicionou-se 25µL de água de alta qualidade tratada com DEPC (dietil pirocarbonato, SIGMA® Chemical Co., Louis, MO, EUA).

Quantificação do RNA

O mRNA de cada amostra foi quantificado duplamente em espectrofotômetro (Nanodrop® /ND 1000 Wilmington-Delaware, EUA) com comprimento de onda 260/280 OD.

Síntese do cDNA

Sintetizou-se o cDNA pela transcrição reversa, utilizando-se 1 µg de RNA, seguindo-se o protocolo descrito por Silva *et al.* (2008). As condições padrão da reação no termociclador foram:

- 1) 70°C por 5 min.
- 2) 4°C por 5 min.
- 3) pausa para adição da enzima.
- 4) 23°C por 5 min.
- 5) 37°C por 1h.
- 6) 90°C por 5 min.

PCR Real Time

As sequências de primers utilizadas para a detecção das citocinas encontram-se na tabela 1:

Iniciadores	Sequência 5' - 3'	BP
HPRT	FW: GTTGGATACAGGCCAGACTTTGTT RV: GATTCAACTTGCGCTCATCTTAGGC	162
TNF- α	FW: ATCTTCTCAAATTCGAGTGACCA RV: TGGAGTAGACAAGGTACAACCC	171
RANK	FW: GTCTTCTGGAACCA TCTTCTCC RV: CACAGACAAATGCAAACCTTG	136
RANKL	FW: CATCCATCGGGTTCCCATAA RV: CCTTAGTTTTCCGTTGCTTAACGAC	103

OPG	FW: TCAAGTGCTTGAGGGGCATAC RV: TGGAGATCGAATTCTGCTTG	225
IFN- γ	FW: CAAGTGGCATAGATGTGGAAGAA RV: TGGCTCTGCAGGATTTTCATG	90
TGF- β	FW: TGACGTCACTGGAGTTGTACG RV: GGTTTCATGTCATGGATGGTGC	169
IL-10	FW: GGTTGCCAAGCCTTATCGGA RV: ACCTGCTCCACTGCCTTGCT	190
IL-4	FW: ACAGGAGAAGGGACGCCAT RV: GAAGCCCTACAGACGAGCTCA	94
IL-6	FW: GGTTGCCAAGCCTTATCGGA RV: ACCTGCTCCACTGCCTTGCT	190

As reações de PCR em tempo real foram realizadas utilizando-se o Step One Real-time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), empregando-se o SYBR-Green detection system (Applied Biosystems). O gene hypoxanthine phosphoribosyltransferase (HPRT) foi amplificado e utilizado para normalizar os níveis de expressão do mRNA. Todas as amostras foram corridas em duplicata em um volume de reação de 20 μ l com 1 μ g do cDNA. Utilizou-se o Sequence Detection Software version v 2.0 (Applied Biosystems) na análise dos dados após a amplificação. Os resultados foram obtidos como valores do limiar do ciclo (threshold cycle - Ct), que representa quantas vezes cada sinal de fluorescência passa por um limiar fixo. Os níveis de expressão foram calculados pelo método do $\Delta\Delta$ Ct. Os valores de Ct são a média de duas medidas independentes, e os níveis de expressão do mRNA das amostras são a razão entre a expressão do

gene de interesse e o HPRT. Todos os dados foram analisados utilizando-se o SPSS statistical program (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Os resultados de expressão gênica nos grupos experimentais são apresentados em razão do resultado observado no grupo controle negativo: devendo-se, assim, considerarem-se como indução, os valores de expressão maiores e diferentes de um e como inibição, os valores menores e diferentes de um.

4.9 Análise Histológica (experimento com agentes clareadores)

As amostras, após fixadas, foram descalcificadas em solução de EDTA a 10% (Merck, Darmstadt, Germany), durante 7 dias. Após inclusão e seccionamento dos cortes, realizou-se colorações pela técnica da Hematoxilina e Eosina a fim de padronizar a presença de osteoclastos nos cortes. A análise da atividade da fosfatase ácida tartarato-resistente (TRAP), foi detectada utilizando-se o kit para fosfatase ácida específica para leucócitos (Sigma Aldrich, St.Louis, MO, USA). Os cortes foram corados com a solução de TRAP durante uma hora, a 37°C e, em seguida, contra coradas com hematoxilina tipo Mayer`s. Foram contados os campos sobre a superfície óssea dentro da área reabsorvida, além de um campo anterior e outro posterior a esta. As células multinucleadas apresentando coloração entre o vermelho escuro e o roxo, foram consideradas TRAP positivas.

4.10 Análise estatística

Todos os dados obtidos foram analisados utilizando-se o SPSS statistical program (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Neste foram analisados pelos métodos não paramétrico de Mann-Whitney e Kruskal Wallis e pela análise de variância (Two way - ANOVA). Os resultados foram considerados significativos, quando $p < 0,05$.

5. Resultados

5.1 Agentes clareadores

Avaliou-se, neste estudo, a atividade das células ósseas em resposta à inoculação das substâncias clareadoras peróxido de carbamida 37% (PC) e perborato de sódio P.A. + peróxido de hidrogênio 20 volumes (PS + H₂O₂ 20 V) no osso da calvária de camundongos. Avaliou-se também a atividade, induzida pela administração do peróxido de hidrogênio 20 volumes (H₂O₂ 20V). Para tal, utilizou-se o método de marcação histoquímica sobre a enzima fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP) no 7^o e 14^o dias após a inoculação dos respectivos agentes clareadores. Inoculou-se água destilada estéril nos camundongos que compuseram o grupo controle negativo.

No sétimo dia após a inoculação, o PS + H₂O₂ 20 V bem como o H₂O₂ 20V induziram um maior número de células TRAP+. Neste mesmo momento, apesar do PC ter induzido uma menor ativação de osteoclastos, este agente estimulou uma contagem celular aproximadamente seis vezes maior do que o grupo tratado com água destilada (p<0,05). No 14^o dia, verificou-se um significativo aumento da ativação celular no grupo inoculado com PC e, uma significativa queda na contagem de células TRAP+ nos animais inoculados com PS + H₂O₂ 20 V (Figura 05). Por sua vez, neste mesmo período, não se alteraram o número de células TRAP+ no grupo com H₂O₂ 20V (p<0,05).

Utilizando-se os mesmos agentes clareadores, em outra etapa experimental realizada nas mesmas condições de inoculação e tempo

anteriormente descritas, avaliou-se a expressão gênica das citocinas RANKL, TNF- α , IL-6, INF- γ e IL-4 por meio do PCR em tempo real. Observou-se que a expressão de mRNA do RANKL em resposta ao H₂O₂ 20V, bem como ao PC, foi similar nos dois momentos avaliados ($p > 0,05$). Por sua vez, observou-se uma expressão significativamente maior no 7^o em relação ao 14^o dia, no grupo tratado com o PS + H₂O₂ 20 V ($p < 0,05$) (Figura 06). Ao se comparar os grupos entre si, observou-se que a expressão do RANKL no 7^o dia foi estatisticamente significativa no grupo tratado com PS + H₂O₂ 20 V em relação aos dois outros grupos ($p < 0,05$). No 14^o dia, contudo, o PS + H₂O₂ 20 V induziu uma menor expressão de RANKL em relação demais agentes ($p < 0,05$).

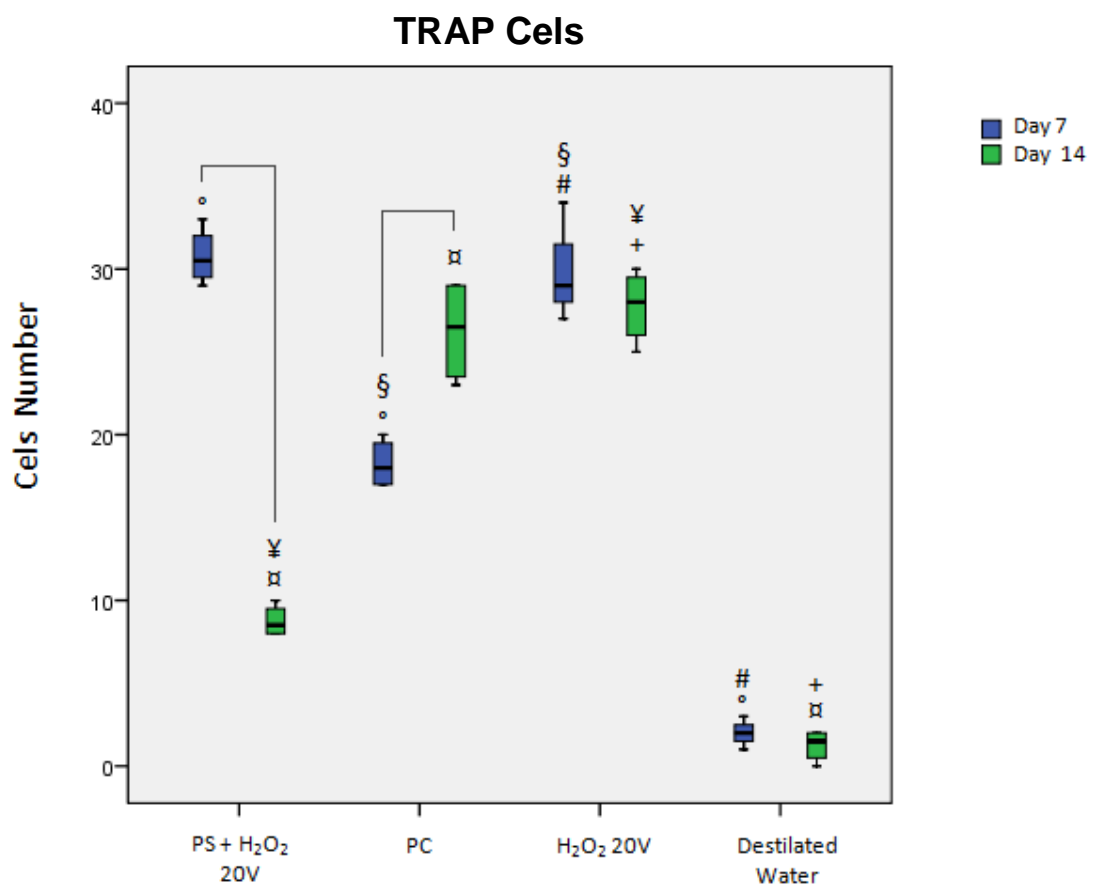


Fig.05 - Número de células TRAP positivas. ¥, °, §, #, + indicam resultados estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).

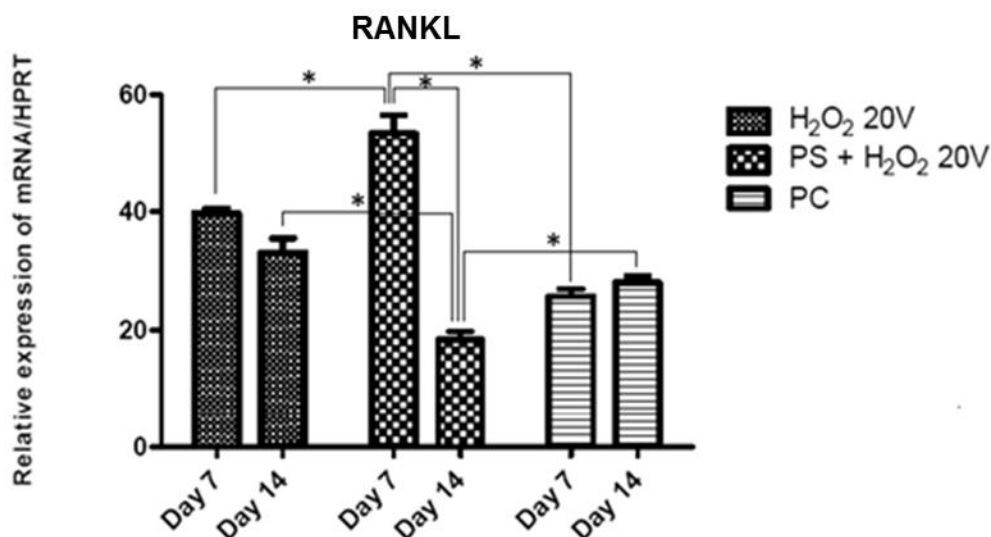


Fig.06 - Expressão do mRNA de RANKL. * indica resultados estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).

No 7º dia, a expressão gênica de TNF- α em resposta ao PS + H₂O₂ 20 V e à H₂O₂ 20 V foi menor do que aquela nos grupos tratados com PC. No 14º dia, ambos PS + H₂O₂ 20 V e a H₂O₂ 20 V induziram um aumento na expressão de TNF- α , com destaque para o H₂O₂ 20 V que foi aproximadamente trinta vezes maior que aquela observada no 7º dia. Quanto ao PC observou uma redução na expressão de TNF- α no 14º em relação ao 7º dia ($p < 0,05$) (Figura 07).

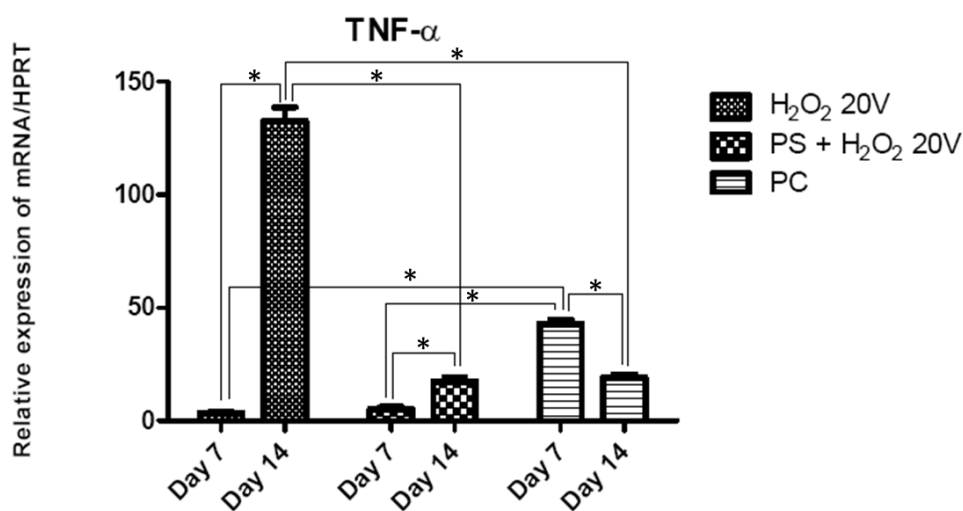


Fig.07 - Expressão do mRNA de TNF- α . * indica resultados estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).

Todos os agentes avaliados induziram aumento da expressão de IL-6 quando comparados os dois períodos de avaliação (14^o e 7^o dias) ($p < 0,05$), com destaque para alta indução estimulada pelo PC. Observou-se também, que a indução do mRNA de IL-6 promovida pelo PC foi estatisticamente maior que aquelas promovidas pelos H₂O₂ 20 V e PS + de H₂O₂ 20V ($p < 0,05$). Estes dois últimos agentes clareadores, em ambos os tempos, induziram expressões semelhantes IL-6 (Figura 08).

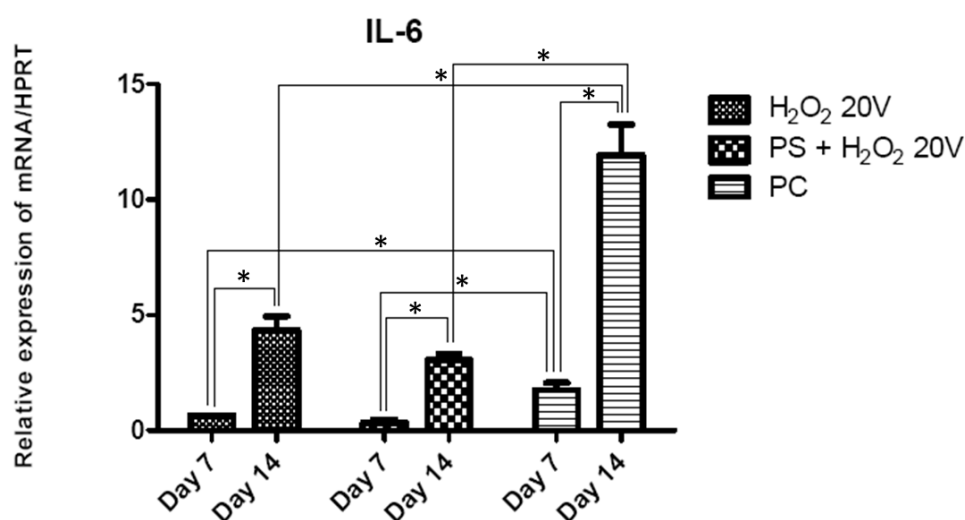


Fig.08 - Expressão do mRNA de IL-6. * indica resultados estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).

A indução da expressão gênica de IFN- γ foi estatisticamente maior no 14^o em relação ao 7^o dia para todos os agentes avaliados ($p < 0,05$), com destaque mais uma vez para a ação do PC, que elevou esta expressão em aproximadamente vinte vezes (Figura 09).

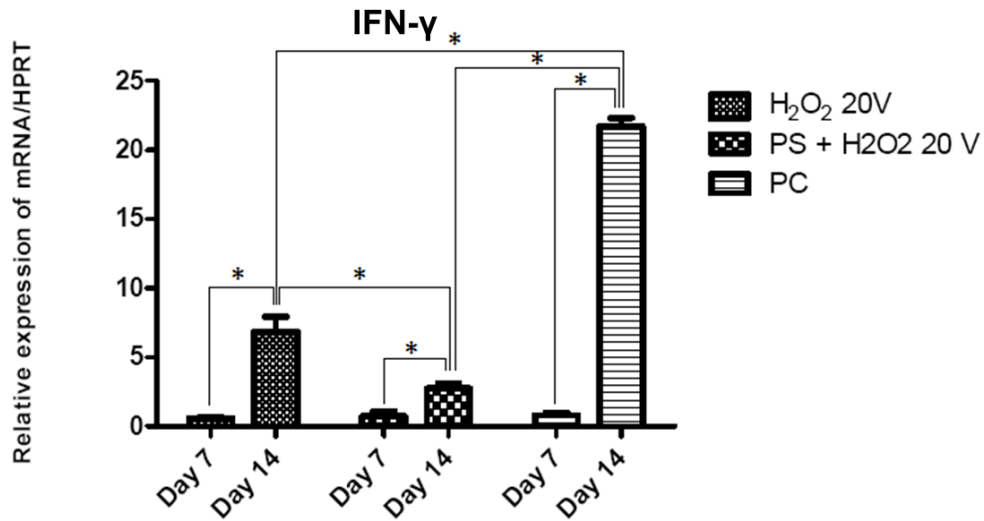


Fig.09 - Expressão do mRNA de IFN- γ . * indica resultados estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).

Observou-se no 7^o dia após a inoculação que o grupo tratado com PC foi aquele no houve a maior expressão do mRNA de IL-4, aproximadamente duas vezes maior que a expressão induzida pelos dois outros agentes. Ao se comparar os dois períodos de avaliação, observou-se que apenas os animais tratados com a H₂O₂ 20 V apresentaram um aumento estatisticamente significativo quanto a expressão do mRNA de IL-4 ($p < 0,05$) (Figura 10).

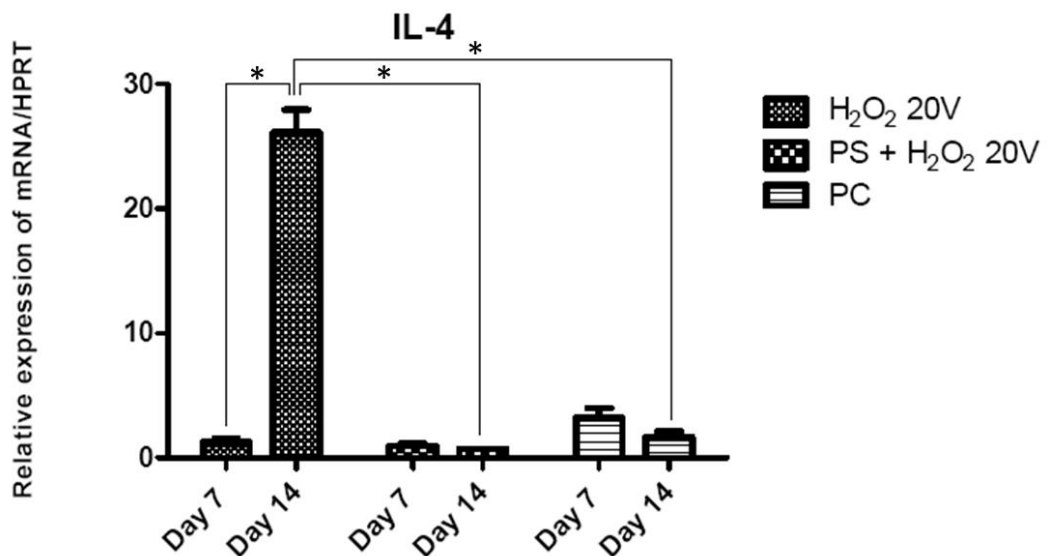
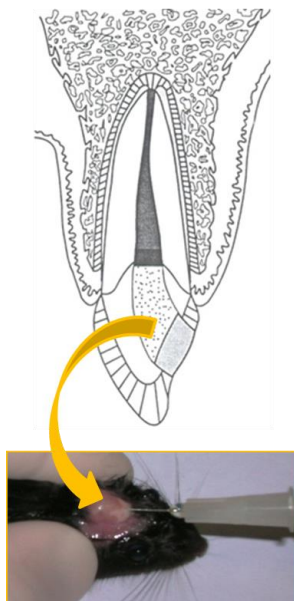


Fig.10 - Expressão do mRNA de IL-4. * indica resultados estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).

Finalmente, sintetizamos os resultados na tabela 1, onde se torna claro os efeitos de cada agente clareador sobre a expressão das diversas citocinas, nos dois tempos avaliados (7^o e 14^o dias).

Agentes Clareadores X Expressão de Citocinas



Efeito sobre a expressão de:	H ₂ O ₂ 20V		PS+H ₂ O ₂ 20V		PC	
	7 ^o dia	14 ^o dia	7 ^o dia	14 ^o dia	7 ^o dia	14 ^o dia
RANKL	Induz* (Ø40)	Induz# (Ø33)	Induz*° (Ø53)	Induz#§ (Ø18)	Induz° (Ø26)	Induz§ (Ø28)
TNF-α	Induz*¥ (Ø3,4)	Induz#§ (Ø 132)	Induz° (Ø 5,2)	Induz# (Ø 17,4)	Induz*°¥ (Ø46)	Induz§ (Ø19)
IL-6	Ñ Altera	Induz#§ (Ø 4,4)	Ñ Altera	Induz#° (Ø 3,1)	Induz (Ø1,8)	Induz§° (Ø12)
IFN-γ	Ñ Altera	Induz*# (Ø 6,9)	Ñ Altera	Induz*§ (Ø 2,75)	Ñ Altera	Induz#§ (Ø21,7)
IL-4	Ñ Altera	Induz* (Ø 26)	Ñ Altera	Ñ Altera	Induz (Ø3,2)	Induz* (Ø1,7)

Tabela 01- Efeito dos agentes clareadores sobre a expressão das citocinas. Os resultados de indução destacados em vermelho indicam diferença estatística entre 7^o e 14^o dias (p<0,05). *, #, °, §, ¥, indicam diferenças estatísticas na comparação entre os agentes (p<0,05).

5.2 Agentes reparadores

Utilizando-se agentes reparadores comumente selecionados para o tratamento de reabsorções cervicais inflamatórias induzidas por agentes clareadores, avaliou-se a expressão gênica das citocinas RANKL, TNF-α, IL-6, INF-γ e IL-4, por meio do PCR em tempo real. Os agentes reparadores selecionados foram o MTA, o Geristore[®] e o Emdogain[®], que foram aplicados em “feridas” cirúrgicas realizadas na calvária de camundongos. As análises

foram procedidas em dois diferentes períodos: 14^o e 21^o dias após a aplicação dos respectivos agentes reparadores.

Observou-se que a expressão do mRNA de RANKL, RANK e OPG foi estatisticamente aumentada ($p < 0,05$) do 14^o para o 21^o dia quando se aplicou os agentes reparadores Emdogain[®] e MTA. Por outro lado o Geristore[®] não alterou a expressão basal destes mediadores no mesmo período de avaliação.

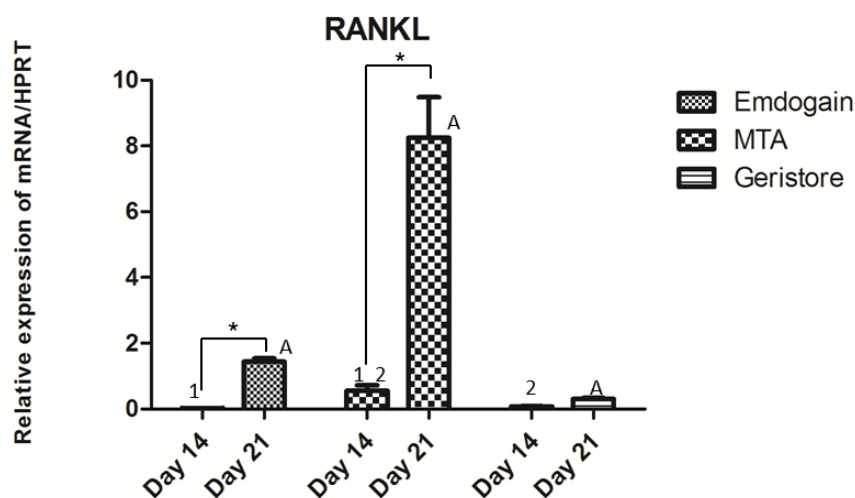


Fig.11 - Expressão do mRNA de RANKL. *, A, 1, 2 indicam resultados estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).

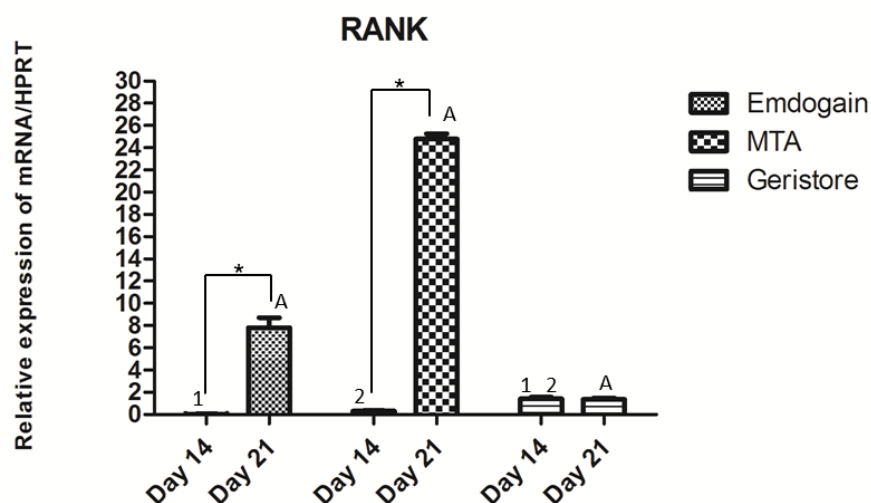


Fig.12 - Expressão do mRNA de RANK. *, A, 1, 2 indicam resultados estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).

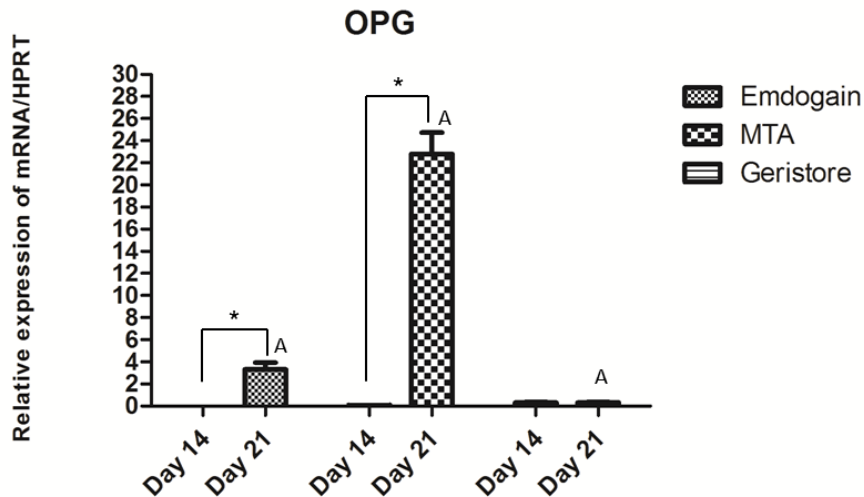


Fig.13 - Expressão do mRNA de OPG. *, A indicam resultados estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).

No que diz respeito à expressão do mRNA de TNF- α , observou-se que o Emdogain[®] estatisticamente aumentou sua expressão ($p < 0,05$), do 14^o para o 21^o dia, e que o MTA não alterou a expressão basal dessa citocina. Por sua vez, verificou-se que a elevada expressão estimulada pelo Geristore[®] no 14^o dia, estatisticamente reduzia no 21^o dia ($p < 0,05$) (Figura 13).

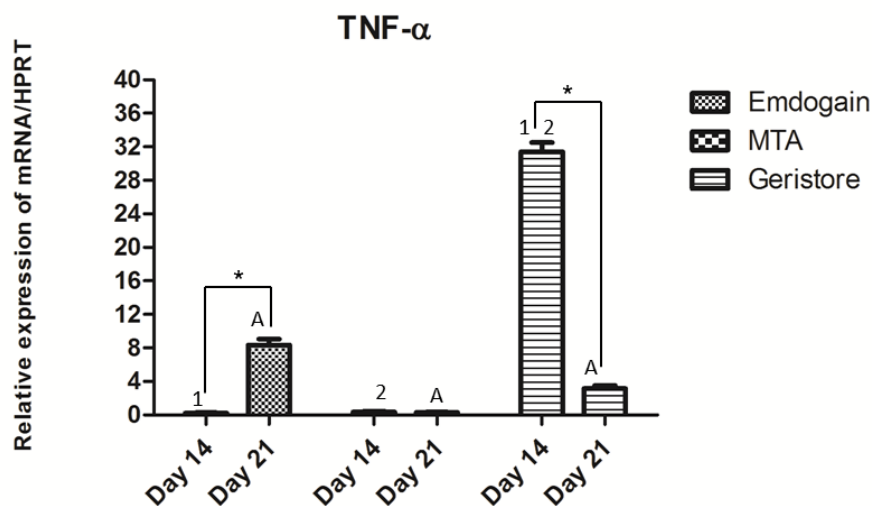


Fig.14 - Expressão do mRNA de TNF- α . *, A, 1, 2 indicam resultados estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).

As expressões do mRNAs de IL-6, das citocinas reguladoras TGF- β e IL-10, da citocina do tipo 2, IL-4 e do IFN- γ , foram estatisticamente aumentadas pelos

agentes Emdogain® e MTA do 14º para o 21º dia. Por sua vez, o Geristore® estatisticamente reduziu a expressão da IL-6, do TGF-β e da IL-4 ($p < 0,05$), enquanto manteve os níveis basais da IL-10 e do IFN-γ nos mesmos períodos (Figuras 13, 14, 15, 17, 18 e 19).

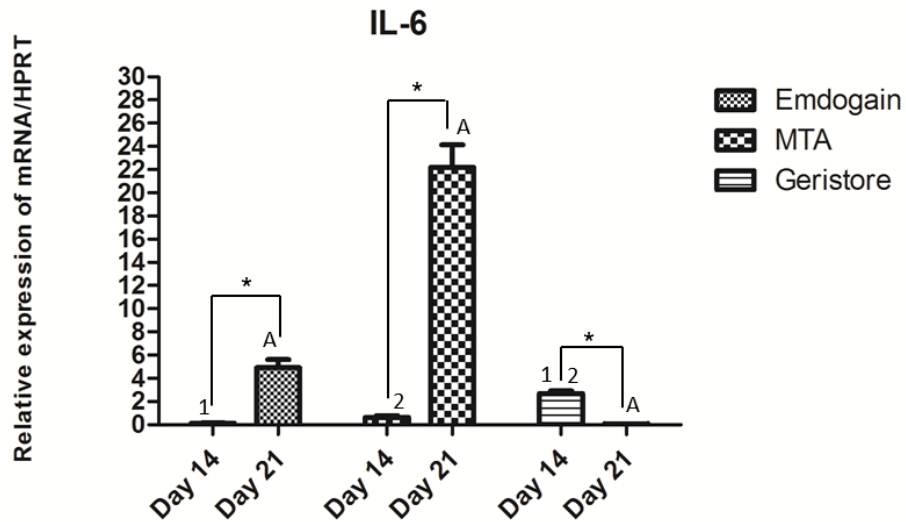


Fig.15 - Expressão do mRNA de IL-6. *, A, 1, 2 indicam resultados estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).

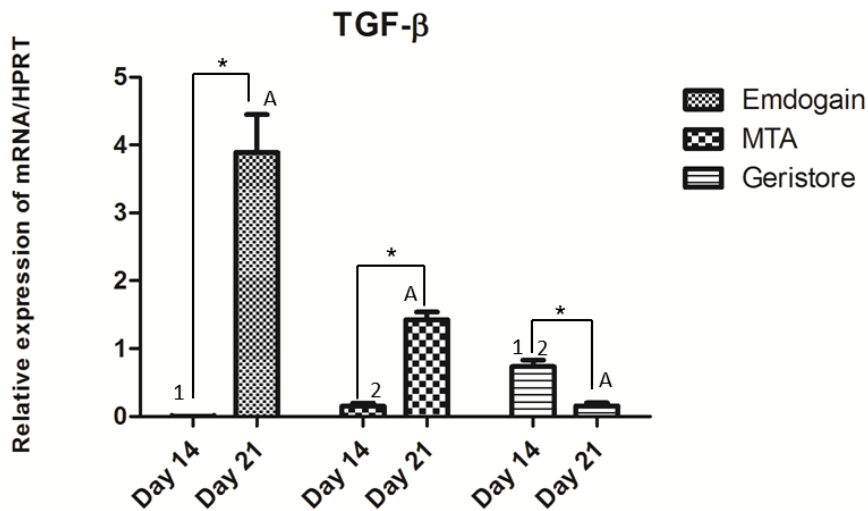


Fig.16 - Expressão do mRNA de TGF-β. *, A, 1, 2 indicam resultados estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).

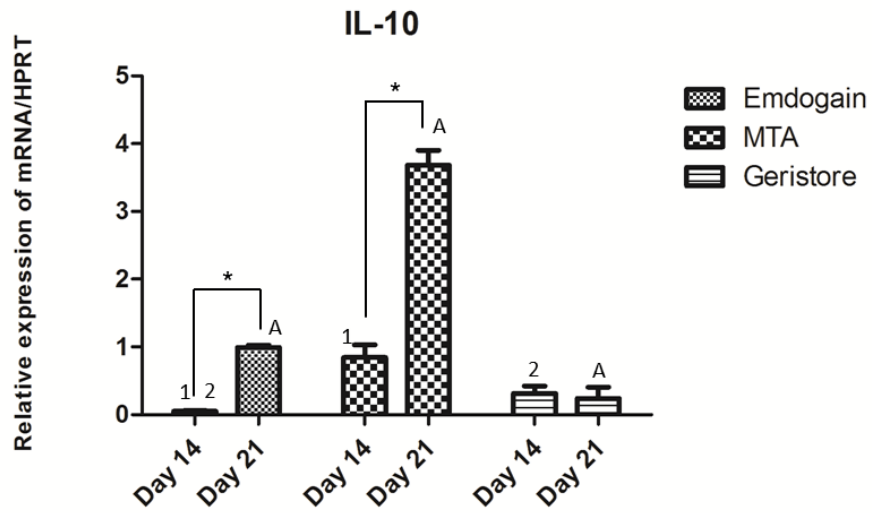


Fig.17 - Expressão do mRNA de IL-10. *, A, 1, 2 indicam resultados estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).

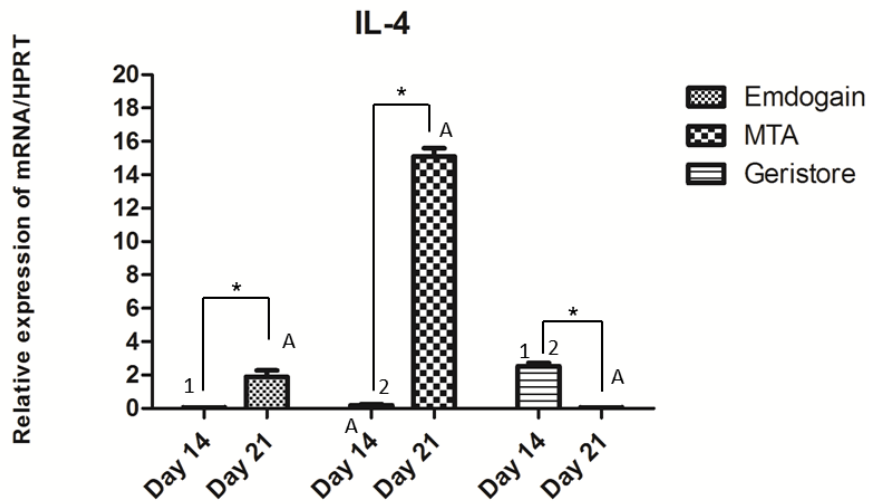


Fig.18 - Expressão do mRNA de IL-4. *, A, 1, 2 indicam resultados estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).

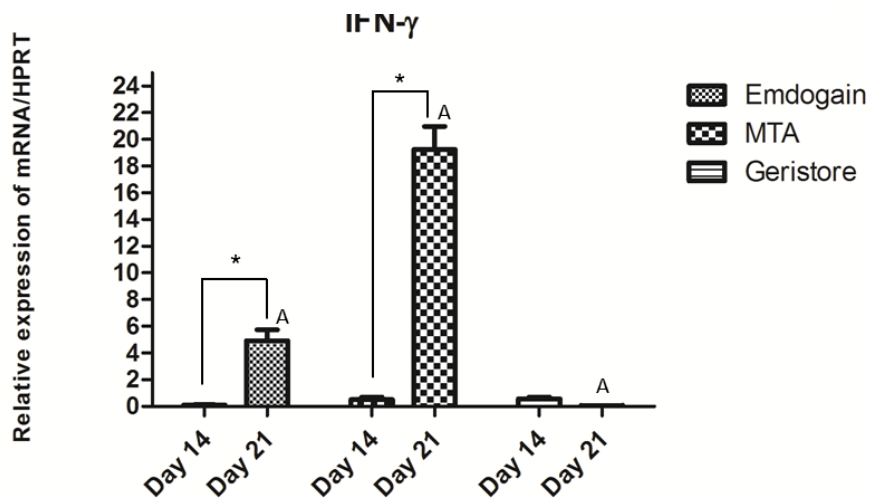
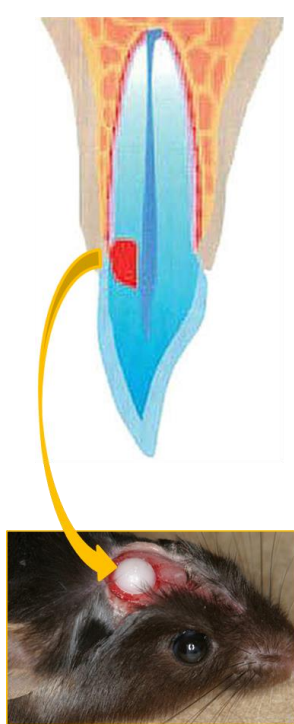


Fig.19 - Expressão do mRNA de IFN- γ . *, A indicam resultados estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).

Na tabela 2, sintetizamos os resultados, onde se torna claro os efeitos de cada agente reparador sobre a expressão das diferentes citocinas, nos dois tempos avaliados (14^o e 21^o dias).

Agentes Reparadores X Expressão de Citocinas



Efeito sobre a expressão de:	Emdogain®		MTA		Geristore®	
	14° dia	21° dia	14° dia	21° dia	14° dia	21° dia
RANKL	Suprime	Induz* (Ø1,6)	Ñ Altera	Induz* (Ø8,25)	Suprime	Suprime
RANK	Suprime	Induz* (Ø7,8)	Suprime	Induz* (Ø24,8)	Ñ Altera	Ñ Altera
OPG	Suprime	Induz* (Ø3,3)	Suprime	Induz* (Ø22,8)	Ñ Altera	Ñ Altera
TNF-α	Ñ Altera	Induz* (Ø8,3)	Ñ Altera	Ñ Altera	Induz (Ø31,4)	Induz* (Ø3,2)
IL-6	Suprime	Induz* (Ø4,9)	Ñ Altera	Induz* (Ø22,2)	Induz (Ø2,7)	Suprime
IL-10	Suprime	Ñ Altera	Ñ Altera	Induz (Ø3,7)	Ñ Altera	Ñ Altera
IFN-γ	Suprime	Induz* (Ø4,9)	Ñ Altera	Induz* (Ø19,2)	Ñ Altera	Suprime
IL-4	Suprime	Induz* (Ø1,9)	Suprime	Induz* (Ø15,1)	Induz (Ø2,5)	Suprime
TGF-β	Suprime	Induz* (Ø3,9)	Suprime	Induz* (Ø1,5)	Ñ Altera	Suprime

Tabela 02- Efeito dos agentes reparadores sobre a expressão das citocinas. Os resultados de indução destacados em vermelho indicam diferença estatística entre 7^o e 14^o dias ($p < 0,05$). * indica diferenças estatísticas na comparação entre os agentes ($p < 0,05$).

6. Discussão

Durante anos buscaram-se materiais que apresentassem baixos efeitos colaterais sobre os tecidos adjacentes, e que promovessem o clareamento dos dentes que apresentam alteração cromática. A estética dental hoje atinge níveis de preocupação e sofisticação que não deixam dúvida a respeito da importância desses procedimentos. Embora eficientes quanto ao aspecto estético, as técnicas de clareamento ainda apresentam graus variáveis de toxicidade e muitas vezes levam ao desenvolvimento de reabsorção cervical inflamatória. Diante dos poucos trabalhos com foco nas respostas imunológicas envolvidas na evolução e regressão desta patologia, avaliamos, neste estudo, os efeitos da aplicação de agentes clareadores tradicionalmente utilizados na clínica, bem como os de agentes reparadores utilizados no tratamento destas alterações sobre tais respostas.

Neste estudo utilizou-se, para a indução de reabsorção óssea, o modelo de inoculação subperiosteal sobre a calvária de camundongos, descrito por Chiang *et al.*, (1999). Esse modelo possibilitou o estudo das alterações inflamatórias induzidas pelos agentes clareadores endógenos no tecido ósseo. Sua utilização para esse fim é inédita, o que de certa forma dificulta a formulação de uma discussão comparativa.

Os osteoclastos ativados expressam a TRAP (Fosfatase ácida resistente aos tartaratos), que é uma enzima que degrada o tecido ósseo e seus constituintes (Zaidi *et al.*, 1989; Moonga *et al.*, 1990). Essa fosfatase ácida

resiste à inibição pelo tartarato. Sua marcação em cortes histológicos é realizada para se determinar a presença de osteoclastos ativados e seus precursores (Hayman *et al.*, 2001). Neste estudo, para se padronizar a presença de osteoclastos nos cortes histológicos, primeiramente eles foram corados com Hematoxilina-Eosina, permitindo que se visualizassem microscopicamente as áreas de reabsorção óssea, confirmando-se a presença dos osteoclastos. Após esse procedimento, cinco cortes sucessivos foram corados para TRAP, selecionando-se o mais central para contagem. Consideraram-se todos os campos dentro da área de reabsorção, além de um campo anterior e um posterior.

Observou-se que todas as substâncias clareadoras aplicadas sobre a calvária dos camundongos induziram a presença de osteoclastos TRAP+ em maiores proporções que quando se aplicou água destilada. O perborato de sódio associado ao peróxido de hidrogênio 20V (PS+ H₂O₂ 20V) e peróxido de hidrogênio 20V (H₂O₂ 20V) induziram de maneira semelhante a diferenciação de osteoclastos TRAP+ após sete dias de sua inoculação, o que sugere que tais efeitos se deve ao H₂O₂ 20V. Nesse mesmo período, o peróxido de carbamida 37% (PC) induziu um número menor de células TRAP+ que os dois agentes descritos anteriormente. Contudo, no 14^o dia, observou-se uma redução do número de células TRAP+ no grupo tratado com a associação (PS+ H₂O₂ 20V) e maior marcação TRAP+ no grupo tratado com o peróxido de carbamida. Tal fato sugere que os efeitos do peróxido de carbamida 37% sobre a diferenciação de osteoclastos ocorre mais tardiamente que o promovido pelo perborato de sódio associado ao peróxido de hidrogênio 20V e pelo peróxido de hidrogênio 20V. No 14^o dia observou-se, também que o PS+H₂O₂ 20V

reduziu a ativação dos osteoclastos enquanto o H₂O₂ 20V manteve o alto número de osteoclastos ativos, sugerindo que o H₂O₂ 20V utilizado nessa associação foi consumido ou neutralizado pelo PS. Sabe-se que a quebra do perborato de sódio se dá de forma lenta, podendo assim influir na liberação de peróxido de hidrogênio também (Rotstein *et al.* 1993). De acordo com os resultados deste estudo, Baek *et al.* (2010) também observaram uma relação dose-efeito entre a administração de peróxido de hidrogênio e o número de células TRAP+, em culturas de células mononucleares de medula.

Após a observação de que os agentes clareadores eram capazes de induzir a diferenciação de osteoclastos (TRAP+), este estudo avaliou a expressão de citocinas, por PCR em tempo real, nos tecidos adjacentes. RANKL é um mediador com ação chave na osteoclastogênese, especificamente na ativação dos osteoclastos (Teitelbaum *et al.*, 2003). Curiosamente, neste estudo, a expressão gênica de RANKL correlacionou-se com a obtida na marcação para TRAP, quanto aos agentes: PS+H₂O₂ 20V e H₂O₂ 20V. Destaca-se que a alta expressão dessa citocina induzida por PS+H₂O₂ 20V, no sétimo dia, e a grande queda, observada no 14º dia, coincidem com a marcação de osteoclastos TRAP+, encontrado previamente. Nesse aspecto, Pi *et al.* (2007) demonstraram uma correlação positiva entre a expressão de RANKL e a administração de H₂O₂. Possivelmente a alta disponibilidade de peróxido de hidrogênio (7º dia) na associação PS+H₂O₂ 20V foi responsável tanto pela elevada expressão gênica de RANKL, quanto pela alta diferenciação de células TRAP+ no mesmo período. A elevada expressão gênica dessa citocina parece ter sido causada pela ação direta do H₂O₂ 20V

em associação ao PS, pois ela não se correlacionou com a expressão das outras citocinas pró-inflamatórias e osteoclastogênicas, TNF- α e IL-6.

O TNF- α é uma citocina multifuncional produzida por macrófagos ativados durante a inflamação (Ragab *et al.*, 2002, Steve *et al.*, 2004). É considerada uma das principais citocinas osteoclastogênicas (Zou *et al.*, 2001). No presente estudo, sua expressão gênica, no 7º dia, induzida pelo PS+H₂O₂ 20V e H₂O₂ 20V, foi menor do que a dos grupos tratados com PC. Contudo, tal resultado se inverte tardiamente, destacando-se a alta expressão de mRNA de TNF- α nos animais inoculados com H₂O₂ 20 V, no 14º dia, o que demonstra o alto poder citotóxico do H₂O₂ 20 V. Clinicamente, observou-se que os camundongos que receberam inoculações com H₂O₂ 35% (aproximadamente 6 X mais concentrado que o H₂O₂ 20 V) tiveram morte instantânea. Olhados esses resultados em conjunto, infere-se que a alta indução de TNF- α seria a responsável pelo quadro de choque séptico que levaria a óbito aqueles animais, como previamente demonstraram (Bhola *et al.*, 2000; Lomas-Neira *et al.*, 2012). Assim os resultados observados neste estudo devem ser considerados durante os procedimentos clínicos, uma vez que o peróxido de hidrogênio parece permanecer atuando tardiamente nos tecidos. A administração direta ou a liberação rápida do mesmo nos tecidos, portanto, deve ser evitada.

A IL-6 é uma citocina com importante função na estimulação de progenitores mesenquimais da linhagem osteoblástica, além de ser potente inibidor da apoptose celular (Ragab *et al.*, 2002; Steve *et al.*, 2004). Ao agir diretamente sobre a osteoclastogênese promove a reabsorção óssea. Mecanismos de ativação indireta, aos quais RANKL participa, também são

associados à IL-6 (Steeve *et al.*, 2004). Observou-se neste estudo que a expressão do mRNA de IL-6 foi induzida por todos agentes após o 14º dia de inoculação, com destaque para a promovida pelo PC. Este resultado correlaciona-se com o aumento da ativação osteoclástica observada no teste de marcação para TRAP, no mesmo período.

Enquanto os mediadores RANKL, TNF- α e IL-6 se inter-relacionam, coordenando positivamente a osteoclastogênese, o IFN- γ age de maneira inversa. O IFN- γ , principalmente aquele originado das células T, inibe a sinalização de RANKL, suprimindo a osteoclastogênese (Takayanagi *et al.*, 2000; 2005). A indução da expressão gênica de IFN- γ foi estatisticamente maior no 14º que no 7º dia, para todos os agentes avaliados ($p < 0,05$), com destaque para a alta indução promovida pelo PC. Provavelmente essa alta expressão, foi um mecanismo de “feedback negativo”, que buscou equilibrar os efeitos pró-osteoclastogênicos induzidos por aquele agente, tal qual demonstraram anteriormente (Takayanagi *et al.*, 2005; Zheng *et al.*, 2006). Esse resultado também é corroborado pela redução do número de células TRAP+, no mesmo período, em resposta ao tratamento com PS+H₂O₂ 20V. Por outro lado, Saidenberg-Kermanac’h *et al.* (2004) sugeriram que o IFN- γ , isoladamente, não seria capaz de inibir os moduladores pró-osteoclastogênicos.

A inibição da osteoclastogênese pode também ser mediada pela ação da IL-4. Esta citocina inibe a expressão de: TNF- α , IL-1, IL-6, IL-11 e bloqueia a via RANK/RANKL (Taki *et al.*, 2000; Wei *et al.*, 2002; Cheng *et al.*, 2011). Saidenberg-Kermanac’h *et al.*(2004) demonstraram que a IL-4 induz e age sinergisticamente com a OPG (osteoprotegerina), prevenindo a perda óssea,

além de estimular a secreção de IFN- γ . De forma interessante, observou-se que a inoculação de H₂O₂ 20V, induziu uma alta expressão gênica de IL-4 no 14º dia, correlacionada a uma alta expressão de mRNA das demais citocinas pró-inflamatórias, RANKL, TNF- α e IL-6, no mesmo período. Provavelmente essa alta expressão foi um mecanismo compensatório para equilibrar a alta resposta pró-inflamatória induzida pelo H₂O₂ 20V. Os demais agentes, PS+H₂O₂ 20V e PC, induziram respectivamente, níveis basais e discreta expressão gênica dessa citocina.

Pôde-se observar que a expressão de mRNA de mediadores pró-inflamatórios e pró-osteoclastogênicos, em resposta à inoculação de H₂O₂ 20V, foi condizente com a alta ativação de osteoclastos (TRAP+). Apesar do H₂O₂ não ser utilizado isoladamente como clareador endógeno nesta concentração (20 Volumes), sua inclusão no modelo de estudo foi necessária, porque o mesmo foi associado ao PS (perborato de sódio) para sua solubilização, conforme procedimento clínico padrão. Mesmo sendo essa associação (PS+H₂O₂ 20V) descrita como uma técnica para o clareamento intracoronário, inicialmente desejávamos analisar os efeitos isolados do PS e, para tal procuramos dissolvê-lo em água destilada. Essa mistura, porém, não apresentou a consistência que possibilitasse sua inoculação na calvária dos camundongos por meio de cânulas e seringas. Pode-se observar (Tabela 1) que os efeitos do H₂O₂ 20V se assemelharam àqueles do PS+H₂O₂ 20V na expressão das citocinas avaliadas, no 7º e 14º dias. A única exceção percebida, se relaciona à expressão da IL-4 no 14º dia, onde o primeiro a induziu e o segundo não a alterou. A menor expressão de mRNA das diferentes citocinas quanto induzidas pelo PS+H₂O₂ 20V em relação ao H₂O₂

20V, talvez se relacione ao observado por Lee *et al.* (2004). Eles demonstraram que a concentração de H₂O₂ no meio extra-celular de dentes tratados com a mistura de perborato de sódio (PS) e água é significativamente menor que no grupo de dentes tratados com a H₂O₂ 35 %. Estando o peróxido de hidrogênio em menor quantidade na associação do que quando isolado, o perborato de sódio dominaria, num segundo momento a ativação celular. Já foi relatado ao longo deste estudo que o perborato de sódio ao se degradar promove uma liberação mais lenta de peróxido de hidrogênio (H₂O₂).

Finalmente, com relação ao PC (Tabela 1) observa-se que esse agente induziu a expressão de todas as citocinas avaliadas, nos dois períodos, com excessão do IFN- γ no 7º dia. Segundo Lee *et al.*, (2004), ambos os clareadores, PC e PS, promovem uma liberação semelhante de peróxido de hidrogênio. Por outro lado, o peróxido de carbamida à 37% gera aproximadamente 12% de peróxido de hidrogênio (Cooper *et al.*, 1992) e essa concentração é maior do que a alcançada com o H₂O₂ 20V, aproximadamente 6% de peróxido de hidrogênio.

Agentes reparadores

Reabsorções externas inflamatórias são quadros degenerativos que muitas vezes podem propiciar a perda do elemento dental. A associação de cirurgias periodontais a agentes reparadores é muitas vezes uma interessante opção na busca da manutenção do elemento dental acometido por esta patologia. Foram testados, neste estudo, três agentes comumente indicados no tratamento destas alterações: o Emdogain[®], o MTA e o Geristore[®].

Utilizou-se o mesmo modelo animal na avaliação dos agentes clareadores, com modificações e inovações. Após a exposição cirúrgica do tecido ósseo e a remoção de sua cortical, os agentes reparadores foram ali colocados. Para a padronização da quantidade e retenção dos agentes reparadores na loja cirúrgica, utilizou-se a extremidade de frascos eppendorf (0,5 ml), seccionadas, com dois milímetros de altura que, posteriormente, foram preenchidas com os respectivos materiais. Após sua colocação na loja cirúrgica, os tecidos foram reposicionados e suturados. Nos períodos avaliados (14^o e 21^o dias), os animais foram sacrificados e as expressões gênicas das citocinas RANKL, TNF- α , IL-6, INF- γ e IL-4, foram determinadas por meio do PCR em tempo real.

RANK/RANKL/OPG constituem uma entidade composta por três citocinas que regulam a patofisiologia óssea. A ligação entre RANK e RANKL determina a diferenciação e ativação osteoclástica. De maneira oposta, a OPG, sintetizada principalmente pelos osteoblastos, inibe a osteoclastogênese ao competir com RANK pela ligação ao RANKL (Stejskal *et al.*, 2001; Boyle *et al.*, 2003; Teitelbaum *et al.*, 2003). Neste estudo, observou-se que os agentes Emdogain[®] e MTA induziram um aumento maior na expressão gênica de RANKL, RANK e OPG, no 21^o dia, ao se comparar com os resultados obtidos no 14^o dia. Provavelmente essa maior expressão de OPG, tardiamente, teria o objetivo de regular a atividade osteoclastogênica promovida pela ligação RANK/RANKL. Com relação ao MTA, os resultados deste estudo estão de acordo com os relatos de Hashiguchi *et al.* (2011). Eles observaram que o MTA não inibe a osteoclastogênese mediada por RANKL, mas, aparentemente, a regula, via indução da expressão de OPG. Resultados similares foram

descritos por Riksen *et al.* (2011), que relataram altos níveis de mRNA de RANKL em culturas de osteoblastos na presença de frações de matrix derivada do esmalte. Nishiguchi *et al.* (2007) descreveram, porém, uma redução nos níveis de expressão de RANKL em culturas de osteoblastos da calvária de camundongos, quando na presença de amelogenina. Outros estudos também apresentaram indícios dessa regulação negativa (Hatakeyama *et al.*, 2003, 2006). Cabe ressaltar, contudo que, embora aumentados os níveis de mRNA de RANK/RANKL/OPG frente ao Emdogain[®], os mesmos foram significativamente menores, comparativamente, aos determinados pelo MTA. O Geristore[®], por sua vez, suprimiu ou induziu a expressão basal desses mediadores, nos dois períodos avaliados.

A expressão de mRNA de TNF- α , que possui importante papel pró-inflamatório e pró-osteoclastogênico, não foi induzida pelo MTA nos dois períodos avaliados. Esse achado está de acordo com os resultados descritos por Rezende *et al.* (2008), que observaram a não interferência do MTA na produção de TNF- α , em culturas de células T de memória, expostas a antígenos bacterianos. Da mesma maneira Barbosa *et al.* (2008) verificaram a não interferência na expressão de mRNA de TNF- α , após a aplicação de MTA sobre perfurações experimentais de furcas. O Emdogain[®] e o Geristore[®], entretanto, induziram a expressão de TNF- α de maneira inversa: enquanto o primeiro a exacerbou no 21^o dia, o segundo a aumentou no 14^o dia. Essa alta expressão de TNF- α promovida pelo Geristore[®] demonstra que esse material induz uma aguda e exarcebada resposta inflamatória inicial. A expressão de mRNA de TNF- α em resposta ao Emdogain[®] correlaciona-se com aquela observada para a tríade RANK/RANKL/OPG.

Como já mencionado anteriormente, a IL-6 regula positivamente a reabsorção óssea e induz a síntese de TNF- α (Steeve *et al.*, 2004). Neste estudo observou-se que o MTA induziu um aumento significativo da expressão da IL-6, do 14° para o 21° dia, de acordo com o observado por Koh *et al.* (1997), que visualizaram um aumento na produção de IL-6, em culturas de osteoblastos, na presença do MTA. Outros estudos relataram resultados similares em culturas de células recuperadas de osteossarcomas humanos tratadas com MTA (Koh *et al.* 1998; Mitchell *et al.* 1999). Tal achado, se correlacionado ao aumento de expressão de RANK/RANKL, nos permitiria inferir que a IL-6 mediaría essa estimulação, por uma via independente de TNF- α . Com relação ao Emdogain[®], observou-se um aumento na expressão da IL-6, entre os dois períodos avaliados. Tal aumento, contudo, foi bem menor que aquele em resposta ao MTA. Por sua vez, a expressão da IL-6, em resposta ao Geristore[®], foi pequena no 14° dia e suprimida no 21° dia. Similarmente, Krifka *et al.* (2010) constataram a redução da síntese de IL-6 em sobrenadantes de culturas de macrófagos expostos ao trietileno-glicol-dimetacrilato (TEGDMA), um dos constituintes do Geristore[®].

Mediadores como a citocina regulatória IL-10, a citonina do tipo 2, IL-4, e o IFN- γ medeiam ações que procuram controlar a reabsorção óssea. A IL-10 diminui a expressão de RANKL, uma das principais citocinas regulatórias da osteoclastogênese (Park-Min *et al.*, 2009). Constitui também uma das vias indutoras da síntese de colágeno e proliferação celular, mediando a polarização dos macrófagos para o subtipo 2 (de Oliveira Mendes *et al.*, 2003). O aumento de expressão de IL-4, *in vivo*: previne a erosão óssea, em modelos animais experimentais de artrite inflamatória (Lubberts *et al.*, 2000; Woods *et*

al., 2001; Saldenber-Kermanach *et al.*, 2004); inibe as ações e síntese das citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-6 (Sugiyama *et al.*, 1995; Wei *et al.*, 2005); e, adicionalmente, induz a expressão de OPG, que antagoniza a ligação de RANKL com o seu receptor (Saldenber-Kermanach *et al.*, 2004). O IFN- γ atua sobre o metabolismo ósseo inibindo a sinalização de RANKL pela degradação de TRAF6, o que resulta na supressão da osteoclastogênese (Takayanagi *et al.*, 2000; 2005). Neste estudo, o tratamento com o MTA e o Emdogain[®] levou ao aumento longitudinal da expressão destes três mediadores. Ressalva-se, nessa observação, que a expressão de IL-10 ao Emdogain[®], apesar de aumentada, manteve-se em níveis basais. Nossos resultados estão de acordo com os de Huang *et al.*(2004), que verificaram o aumento na produção de IL-10 e IL-4 em culturas de células de osteossarcoma humano, na presença de MTA. O aumento na síntese de IFN- γ , em resposta ao MTA, foi também demonstrado por Rezende *et al.*(2008), em culturas de linfócitos T. Existem evidências de que a ação da amelogenina (Emdogain[®]) sobre o tecido ósseo apresenta um caráter anti-inflamatório, bem como anti-osteoclastogênico (Hatakeyama *et al.*, 2003, 2006; Grayson *et al.*, 2006) . No presente estudo a alta expressão detectada de IL-4 e IFN- γ , em resposta ao Emdogain[®], reforçam esses indícios. No que se refere ao Geristore[®], observou-se uma pequena regulação positiva da IL-4, no 14^o dia, correlacionada com uma alta expressão de TNF- α , observada no mesmo período.

O TGF- β é considerado um importante regulador da atividade de osteoblastos e osteoclastos (Centrella *et al.*, 1991): participa dos ciclos de reabsorção e remodelação óssea (Martim & Sims, 2005). Pode propiciar diretamente a diferenciação de osteoclastos pela supressão de mediadores

inflamatórios como o IFN- γ e a IL-10. Por outro lado, o TGF- β inibe a osteoclastogênese, limitando a disponibilização de RANKL via indução de OPG. Adicionalmente, essa citocina tem papel importante nos processos cicatriciais, induzindo a expressão de proteínas de reparo (Fox & Lovibond 2005). Neste estudo, o MTA e o Emdogain[®] propiciaram o aumento da expressão de TGF- β , no 21°. Este achado correlaciona-se positivamente com a alta expressão das citocinas anti-osteoclastogênicas, IL-4, IFN- γ , OPG e IL-10 (MTA). De acordo com esse resultado, Guven *et al.* (2007) e Fayazi *et al.* (2011), respectivamente, em culturas de células do tecido gengival e no ligamento periodontal, observaram um aumento na produção de TGF- β , na presença de MTA. Grayson *et al.* (2006), na presença de amelogenina, encontraram resultados similares. Quanto ao Geristore[®], observou-se apenas nível basal de expressão inicial e supressão de TGF- β no 21° dia. Esse achado correlaciona-se à alta expressão de TNF- α , observada no mesmo período.

Em resumo, ambos os agentes reparadores, MTA e Emdogain[®], induziram aumento da expressão do mRNA dos moduladores pró-osteoclastogênicos (RANK, RANKL, IL-6 e TNF- α), bem como da expressão de moduladores anti-osteoclastogênicos (OPG, IL-10, IL-4, IFN- γ e TGF- β), no 21° dia, sugerindo que uma modulação imune se iniciou nesse período (Tabela 2). Por sua vez, o tratamento com Geristore[®] promoveu menores alterações sobre os parâmetros avaliados. Destaca-se, contudo, uma alta indução na expressão de TNF- α , no 14° dia, mas também uma redução na expressão de RANKL, nos dois períodos avaliados. Sua indicação clínica deve ser vista à luz desses achados: se não interfere na expressão das citocinas envolvidas na

remodelação óssea, também não o faz na expressão da tríade RANK/RANKL/OPG.

7. Conclusão

Pôde-se observar que:

1. O Perborato de sódio, associado ao peróxido de carbamida (PS+ H₂O₂ 20V), o peróxido de carbamida 37% (PC) e o peróxido de hidrogênio (H₂O₂ 20V):
 - Induziram uma maior expressão de células TRAP+, no 7° e 14° dias;
 - Induziram a expressão do mRNA de RANKL e TNF-α, no 7° e 14° dias;
2. O Perborato de sódio, associado ao peróxido de carbamida (PS+ H₂O₂ 20V), e o peróxido de hidrogênio (H₂O₂ 20V):
 - Induziram a expressão do mRNA de IL-6 e IFN-γ, no 14° dia;
 - Não alteraram a expressão do mRNA de IL-6 e IFN-γ, no 7° dia;
3. O peróxido de carbamida 37% (PC):
 - Induziu a expressão do mRNA de IL-6 e IL-4, no 7° e 14° dias;
 - Induziu a expressão do mRNA de IFN-γ, no 14° dia;

4. O Emdogain® e MTA:

- Induziram a expressão do mRNA de RANKL, RANK, OPG, IL-6, IFN- γ , IL-4 e TGF- β , no 21° dia;
- Suprimiram ou não alteraram a expressão do mRNA de RANKL, RANK, OPG, IL-6, IFN- γ , IL-4 e TGF- β , IL10 e TNF- α , no 7° dia;

5. O Geristore®:

- Induziu a expressão do mRNA de TNF- α , IL-6 e IL-4, no 7° dia;
- Induziu a expressão do mRNA de TNF- α , no 14° dia;
- Suprimiu ou não alterou a expressão dos demais mediadores.

Conclui-se que:

O modelo utilizado neste estudo, pioneiro em avaliar os efeitos de agentes clareadores e reparadores sobre a atividade de células ósseas, foi efetivo na simulação da reabsorção cervical, bem como da ação dos agentes reparadores sobre a atividade dessas células, permitindo a análise da expressão de importantes mediadores envolvidos no metabolismo ósseo.

8. Referências Bibliográficas

ABITBOL, T.; SANTI, E.; SCHERER, W. Use of a resin-ionomer in guided tissue regeneration: case reports. *Am J Dent.*, v. 8, n. 5, p. 267-269, 1995.

ABITBOL, T.; SANTI, E.; SCHERER, W.; PALAT, M. Using a resin-ionomer in guided tissue regenerative procedures: technique and application--case reports. *Periodontal Clin Investig.*, v. 18, n. 1, p. 17-21, 1996.

ABU-AMER, Y.; ROSS, F.P.; EDWARDS, J.; TEITELBAUM, S.L. Lipopolysaccharide-stimulated osteoclastogenesis is mediated by tumor necrosis factor via its P55 receptor. *J Clin Invest*, v.100, p.1557-1565, 1997. In: CUZZOCREA, S.; *et al.* Inducible nitric oxide synthase mediates bone loss in ovariectomized mice. *Endocrinol.*, v.144, p.1098-1107, 2003.

ALBERS, H.F et al. Lightening natural teeth. *Adept Report*, v.2, n.1, p.1-24, 1991.

ALLEN, J. B.; WONG, H. L.; COSTA, G. L.; BIENKOWSKI, M. J.; WAHL, S. M. Suppression of monocyte function and differential regulation of IL-1 and IL-1ra by IL-4 contribute to resolution of experimental arthritis. *J Immunol.*, v. 151, n. 8, p. 4344-4351, 1993.

ANDREASEN, J. O.; HJORTING-HANSEN, E. Replantation of teeth. I. Radiographic and clinical study of 110 human teeth replanted after accidental loss. *Acta Odontol Scand.*, v. 24, n. 3, p. 263-286, 1966,

ANDREASEN, J. O.; HJORTING-HANSEN, E. Replantation of teeth. II. Histological study of 22 replanted anterior teeth in humans. *Acta Odontol Scand.*, v. 24, n. 3, p. 287-306, 1966.

ANDREASEN, J.O. Interrelation between alveolar bone and periodontal ligament repair after replantation of mature permanent incisors in monkeys. *J Period Res*, v.16, n.2, p.228-235, 1981.

AL-SABEK, F.; SHOSTAD, S.; KIRKWOOD, K. L. Preferential attachment of human gingival fibroblasts to the resin ionomer Geristore. *J Endod.*, v. 31, n. 3, p. 205-208, 2005.

ASFORA, K.K.; SANTOS, M.C.M.S.; MONTES, M.A.J.R.; CASTRO, C.M.M.B. Evaluation of biocompatibility of sodium perborate and 30% hydrogen peroxide using the analysis of the adherence capacity and morphology of macrophages. *J Dent*, v.33, p.155-162, 2005.

AZUMA, Y.; KAJI, K.; KATOOGI, R.; TAKESHITA, S.; KUDO, A. Tumor necrosis factor-alpha induces differentiation of and bone resorption by osteoclasts. *J Biol Chem.*, v. 275, n. 7, p. 4858-4864, 2000.

BAECKER N.; BESE, A.; SCOENAU, E.; GERZER, R.; HEER, M. L-arginine, the natural precursor of NO, is not effective for preventing bone loss in postmenopausal women. *J Bone Miner Res.* Mar;20(3):471-9, 2005.

BARATIERI et al. Clareamento de dentes. In: *Odontologia Restauradora – fundamentos e possibilidades*. São Paulo: Quintessence, 2001, cap.17, p.675-722.

BARATIERI, L.N.; MONTEIRO, JR. S.; ANDRADA, M.A.C.; VIEIRA, L.C.C. *Clareamento Dental*. 1 ed., São Paulo: Quintessence, 1993.

BARBOSA SILVA, M. J.; VIEIRA, L. Q.; SOBRINHO, A. P. The effects of mineral trioxide aggregates on cytokine production by mouse pulp tissue. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.*, v. 105, n. 5, p. 70-76, 2008.

BARGHOLZ, C. Perforation repair with mineral trioxide aggregate: a modified matrix concept. *Int Endod J.*, v. 38, n. 1, p. 59-69, 2005.

BARRETT, E. J.; KENNY, D. J.; TENENBAUM, H. C.; SIGAL, M. J.; JOHNSTON, D. H. Replantation of permanent incisors in children using Emdogain. *Dent Traumatol.*, v. 21, n. 5, p. 269-275, 2005.

BEHNIA, A.; STRASSLER, H. E.; CAMPBELL, R. Repairing iatrogenic root perforations. *J Am Dent Assoc.*, v. 131, n. 2, p. 196-201, 2000.

BESSIS, N.; CHIOCCHIA, G.; KOLLIAS, G.; MINTY, A.; FOURNIER, C.; FRADELIZI, D.; BOISSIER, M. C. Modulation of proinflammatory cytokine production in tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha)-transgenic mice by treatment with cells engineered to secrete IL-4, IL-10 or IL-13. *Clin Exp Immunol.*, v. 111, n. 2, p. 391-396, 1998.

BILLIAU, A.; HEREMANS, H.; VERMEIRE, K.; MATTHYS, P. Immunomodulatory properties of interferon-gamma. An update. *Ann N Y Acad Sci.*, n. 856, p. 22-32, 1998.

BINGHAM 3rd, CO. The pathogenesis of rheumatoid arthritis: pivotal cytokines involved in bone degradation and inflammation. *J Rheumatol*, v.65, p.3-9, 2002.

BOGUE, E.A. Bleaching teeth. *Dent Cosmos*, v.14, n.1, p.1-3, 1872.

BOYLE, W. J., SIMONET, W. S., LACEY, D. L. Osteoclast differentiation and activation. *Nature*, v. 423, n. 6937, p. 337-342, 2003.

BHOLA M, GOTO M, CHEN HY, MYERS TF. Effect of polyclonal anti-TNFalpha antibody on endotoxic shock in suckling rats. *Biol Neonate*. V.78,n. 3, p.207-11, 2000.

BRANDI, M.L.; HUKKANEN, M.; UMEDA, T.; MORADI-BIDHENDI, N.; BIANCHI, S.; GROSS, S.S.; POLAK, J.; MACINTYRE, I. Bidirectional regulation of osteoclast function by nitric oxide synthase isoforms. *Proc Natl Acad Sci USA*, v.92, p.2954-2958, 1995.

BRESNIHAN, B.; ALVARO-GRACIA, J.M.; COBBY, M.; DOHERTY, M.; DOMLJAN, Z.; EMERY, P.; NUKI, G.; PAVELKA, K.; RAU, R.; ROZMAN, B.; *et al.* Treatment of rheumatoid arthritis with recombinant human interleukin-1 receptor antagonist. *Arth Rheum*, v.41, p.2196-2204, 1998.

BURCHARD, H.H. A textbook of dental pathology and therapeutics. Philadelphia: Lea & Febiger, 1898.

BUSATO, A.L.S.; HERNANDEZ, P.A.G.; MACEDO, R.P. Tratamento do discromatismo dental. In: *Dentística Restaurações Estéticas*. São Paulo: Artes Médicas, 2002, cap.12, p.489-574.

CENTRELLA M, MCCARTHY TL, CANALIS E. Transforming growth factor-beta and remodeling of bone. *J Bone Joint Surg Am*. v. 73, n. 9, p.1418-28, 1991.

CHAE, H.; PARK, R.; CHUNG, H.; KANG, J.; KIM, M.; CHOI, D.; BANG, B.; KIM, H. Nitric oxide is a regulator of bone remodeling. *J Pharm Pharmacol*, v.49, p.897-902, 1997.

CHARPLE, J.A. Restoring discolored teeth to normal. *Dent Cosmos*, v.19, n.9, p.498-499, 1877.

CHENG J, LIU J, SHI Z, XU D, LUO S, SIEGAL GP, FENG X, WEI S. Interleukin-4 inhibits RANKL-induced NFATc1 expression via STAT6: a novel mechanism mediating its blockade of osteoclastogenesis. *J Cell Biochem*. V. 112, n.11,p. 3385-92, 2011.

CHIANG CY, KYRITSIS G, GRAVES DT, AMAR S. Interleukin-1 and tumor necrosis factor activities partially account for calvarial bone resorption induced by local injection of lipopolysaccharide. *Infect Immun*. Aug;67(8), p.4231-6, 1999.

CHO, E.; KOPEL, H.; WHITE, S.N. Moisture susceptibility of resin-modified glass-ionomer materials. *Quintessence Int.*, v. 26, n. 5, p. 351-358, 1995.

COHEN, S; BURNS, R.C. Caminhos da polpa. 6ª ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 1997. c. 13, p. 364-377.

COHEN, S. A simplified method for bleaching discolored teeth. *Dent Dig*, v.74, n.7, p.301-303, 1968.

COLLIN-OSDOBY, P.; ROTHE, L.; BEKKER, S.; ANDERSON, F.; OSDOBY, P. Decreased nitric oxide levels stimulate osteoclastogenesis and bone resorption both in vitro and in vivo on the chick chorioallantoic membrane in association with neoangiogenesis. *J Bone Miner Res*, v.15, p.474-488, 2000.

COOPER JS, BOKMEYER TJ, BOWLES WH. Penetration of the pulp chamber by carbamide peroxide bleaching agents. J Endod. V.18, n. 7, p. 315-7,1992.

CUZZOCREA, S.; MAZZON, E.; DUGO, L.; GENOVESE, T.; DI PAOLA, R.; RUGGERI, Z.; VEGETO, E.; CAPUTI, A.; VAN DE LOO, R.; PUZZOLO, D.; MAGGI, A. Inducible nitric oxide synthase mediates bone loss in ovariectomized mice. Endocrinol, v.144, p.1098-1107, 2003.

DAHLSTRON, S.W. Hydroxy radical activity in bleached root filled teeth. Aust Endod Newsletter, v.19, n.1, p.30-31, 1993.

DE DEUS, Q.D. Clareamento de dentes com alteração de cor. In: Endodontia. 4 ed., Rio de Janeiro: Medsi, 1986, cap.20, p.491-500.

DE LA MATA, J.; UY, H.L.; GUISE, T.A.; STORY, B.; BOYCE, B.F.; MUNDY, G.R.; *et al.* Interleukin-6 enhances hypercalcemia and bone resorption mediated by parathyroid hormone-related protein in vivo. J Clin Invest, v.95, p.2846-2852, 1995.

DEMARCO, F.F.; GARONE NETTO, N. Rev Odont Univ São Paulo, v.9, n.1, p.51-58, Jan./Mar. 1995.

DE OLIVEIRA MENDES, S. T.; RIBEIRO SOBRINHO, A. P.; DE CARVALHO, A. T.; DE SOUZA CÔRTEZ, M. I.; VIEIRA, L. Q. In vitro evaluation of the cytotoxicity of two root canal sealers on macrophage activity. J Endod., v. 29, n, 2, p. 95-99, 2003.

DEVLIN, R.D.; REDDY, S.V.; SAVINO, R.; CILIBERTO, G.; ROODMAN, D. IL-6 mediates the effects of IL-1 or TNF, but not PTHrp or 1,25(OH)2D3, on osteoclast-like cell formation in normal human bone marrow cultures. J Bone Miner Res, v.13, p.393-399, 1998.

DINARELLO, C.A. The interleukin-1 family: 10 years of discovery. FASEB J, v.8, p.1314-1325, 1994.

DOTTO, S.R.; FERREIRA, R.; PASQUALI, P.E.; DOTTO, G.N. Reabsorção cervical da raiz – um risco do clareamento não vital. Rev Passo Fundo, v.5, n.1, p.17-20, Jan./Jun., 2000.

DUNN, G. P.; KOEBEL, C. M.; SCHREIBER, R. D. Interferons, immunity and cancer immunoediting. Nat Rev Immunol., v. 6, n. 11, p. 836-848, 2006.

DZIERZAK, J. Factors which cause tooth color changes. Protocol for in-office “power” bleaching. Bleach Report, v.3,n.2, p.15-20, 1991.

ESTEVEZ, R.; ARANGUREN, J.; ESCORIAL, A.; DE GREGORIO, C.; DE LA TORRE, F.; VERA, J.; CISNEROS, R. Invasive cervical resorption Class III in a maxillary central incisor: diagnosis and follow-up by means of cone-beam computed tomography. J Endod., v. 36, n. 12, p. 2012-2014, 2010.

FASANARO, T. Bleaching teeth. History, chemicals and materials used for common tooth discolorations. *J Esthet Dent*, v.4, n.3, p.71-78, 1992.

FAYAZI S, OSTAD SN, RAZMI H. Effect of ProRoot MTA, Portland cement, and amalgam on the expression of fibronectin, collagen I, and TGF β by human periodontal ligament fibroblasts in vitro. *Indian J Dent Res* .v. 22, n. 2, p.190-4, 2011.

FILIPPI, A.; POHL, Y.; VON ARX, T. Treatment of replacement resorption with Emdogain--a prospective clinical study. *Dent Traumatol.*, v. 18, n. 3, p. 138-143, 2002.

FISHER, G. The bleaching of discolored teeth with H₂O₂. *Dent Cosmos*, v.53, p.246-247, 1911.

FONG, C. D.; HAMMARSTRÖM, L. Expression of amelin and amelogenin in epithelial root sheath remnants of fully formed rat molars. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, v. 90, n. 2, p. 218-223, 2000.

FONSECA, A.M.A.; BAHIA, M.G.A. Reabsorção radicular inflamatória externa: etiologia, mecanismo de ação e tratamento. *Rev CROMG*, v.1, n.2, p.80-85, Ago./Dez. 1995.

FOX, S.W.; CHOW J.W. Nitric Oxide synthase expression in bone cells. *Bone*, v.23, p.1-6, 1998.

FOX, S. W.; LOVIBOND, A. C. Current insights into the role of transforming growth factor-beta in bone resorption. *Mol Cell Endocrinol.*, v. 243, n. 1-2, p. 19-26, 2005.

FRANK, A.L. Branqueamento de dentes polpados e despolpados. In: COEHN, S.; BURNS, R.C. Caminhos da polpa. São Paulo: Guanabara Koogan, 1982. p.541-547.

FUSS, Z.; TESIS, I.; LIN, S. Root resorption--diagnosis, classification and treatment choices based on stimulation factors. *Dent Traumatol.*, v.19, n. 4, p. 175-182, 2003.

GAO, Y.; GRASSI, F.; RYAN, M. R.; TERAUCHI, M.; PAGE, K.; YANG, X.; WEITZMANN, M. N.; PACIFICI, R. IFN-gamma stimulates osteoclast formation and bone loss in vivo via antigen-driven T cell activation. *J Clin Invest.*, v. 117, n. 1, p. 122-132, 2007.

GOHDA, J.; AKIYAMA, T.; KOGA, T.; TAKAYANAGI, H., TANAKA, S., INOUE, J. RANK-mediated amplification of TRAF6 signaling leads to NFATc1 induction during osteoclastogenesis. *EMBO J.*, v. 24, n. 4, p. 790-799, 2005.

GOLD, S. I.; HASSELGREN, G. Peripheral inflammatory root resorption. A review of the literature with case reports. *J Clin Periodontol*, v. 19, n. 8, p. 523-534, 1992.

GOLDSTEIN, R. Esthetics in Dentistry. Philadelphia: Lippincott, 1976.

GÖTZ, W.; QUONDAMATTEO, F.; RAGOTZKI, S.; AFFELDT, J.; JÄGER A. Localization of cathepsin D in human odontoclasts. a light and electron microscopical immunocytochemical study. Connect Tissue Res., v. 41, n. 3, p. 185-194, 2000.

GUVEN G, CEHRELI ZC, URAL A, SERDAR MA, BASAK F. Effect of mineral trioxide aggregate cements on transforming growth factor beta1 and bone morphogenetic protein production by human fibroblasts in vitro. J Endod. v.33, n.4, p. 447-50, 2007.

GYURKO, R.; SHOJI, H.; BATTAGLINO, R.A.; BOUSTANY, G.; GIBSON III, F.C.; GENCO, C.A.; STASHENKO, P.; VAN DYKE, T.E. Inducible nitric oxide synthase mediates bone development and *P. gingivalis*-induced alveolar bone loss. Bone, v.36, p.472-479, 2005.

HAMAMOTO, Y.; KAWASAKI, N.; JARNBRING, F.; HAMMARSTRÖM, L. Effects and distribution of the enamel matrix derivative Emdogain in the periodontal tissues of rat molars transplanted to the abdominal wall. Dent Traumatol., v. 18, n.1, p. 12-23, 2002.

HAMMARSTRÖM, L. E.; HANKER, J. S.; TOVERUD, S. U. Cellular differences in acid phosphatase isoenzymes in bone and teeth. Clin Orthop Relat Res., v. 78, p. 151-167, 1971.

HAMMARSTRÖM, L.E. & LINDSKOG, S. General morphological aspects of resorption of teeth and alveolar bone. Inter Endod J, v.18, p.93-108, 1985.

HAMMARSTRÖM, L.; LINDSKOG, S. Factors regulating and modifying dental root resorption. Proc Finn Dent Soc., v. 88, n.1, p. 115-123, 1992.

HAHN, C. L; LIEWEHR, F. R. Innate immune responses of the dental pulp to caries. J Endod., v. 33, n. 6, p. 643-651, 2007.

HARDMAN, P.K.; MOORE, D.L.; PETTEWAY, G.H. Stability of hydrogen peroxide as a bleaching agent. Gen Dent, v.33, p.121-122, 1985.

HARLAN, A.W. The removal of stain from the teeth caused by administration of medicinal agents and the bleaching of pulpless teeth. AJD Sci, v.29, p.101, 1884 – 1885.

HARRINGTON, G.W.; NATKIN, E. External resorption associated with bleaching of pulpless teeth. J Endod, v.5, n.11, p.344-348, 1979.

HATTAB, F.N.; QUDEIMAT, M.A.; AL-RIMAWI, H.S. Dental discoloration: an overview. J Esthet Dent, v.11, p.291-310, 1999.

HATAKEYAMA, J.; SREENATH, T.; HATAKEYAMA, Y.; THYAGARAJAN, T.; SHUM, L.; GIBSON, C. W.; WRIGHT, J. T.; KULKARNI, A. B. The receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand-mediated osteoclastogenic pathway is elevated in amelogenin-null mice. *J Biol Chem.*, v.278, n. 37, p. 35743-35748, 2003.

HATAKEYAMA, J.; PHILP, D.; HATAKEYAMA, Y.; HARUYAMA, N.; SHUM, L.; ARAGON, M. A.; YUAN, Z.; GIBSON, C. W.; SREENATH, T.; KLEINMAN, H. K.; KULKARNI, A. B. Amelogenin-mediated regulation of osteoclastogenesis, and periodontal cell proliferation and migration. *J Dent Res.*, v. 85, n. 2, p. 144-149, 2006.

HATTERSLEY, G.; DOREY, E.; HORTON, M.A.; CHAMBERS, T.J. Human macrophage colony-stimulating factor inhibits bone resorption by osteoclasts disaggregated from rat bone. *J Cell Physiol*, v.137, p.199-203, 1988.

HAYMAN AR, MACARY P, LEHNER PJ, COX TM. Tartrate-resistant acid phosphatase (Acp 5): identification in diverse human tissues and dendritic cells. *J Histochem Cytochem.* Jun;49(6), p.675-84, 2001.

HAYWOOD, V.B. Bleaching of vital and nonvital teeth. *Curr Opin Dent Mar*, v.2, p.142-149, 1992.

HAYWOOD, V.B. History, safety and effectiveness of current bleaching techniques and applications of the nightguard vital bleaching technique. *Quintessence Int*, v.23, n.7, p.471-488, 1992.

HASHIGUCHI D, FUKUSHIMA H, YASUDA H, MASUDA W, TOMIKAWA M, MORIKAWA K, MAKI K, JIMI E. Mineral trioxide aggregate inhibits osteoclastic bone resorption. *J Dent Res.* V. 90, n. 7, p. 912-7, 2011.

HASHIGUCHI D, FUKUSHIMA H, NAKAMURA M, MORIKAWA K, YASUDA H, UDAGAWA N, MAKI K, JIMI E. Mineral trioxide aggregate solution inhibits osteoclast differentiation through the maintenance of osteoprotegerin expression in osteoblasts. *J Biomed Mater Res A.* v. 96, n. 2, p. 358-64, 2011.

HEITHERSAY, G.S. Clinical, radiologic and histopathologic features of invasive cervical resorption. *Quintessence Int*, v.30, p.27-37, 1999.

HEITHERSAY, G.S. Treatment of invasive cervical resorption: an analysis of results using topical application of trichloroacetic acid, curettage and restoration. *Quintessence Int*, v.30, p.96-110, 1999.

HILL, P.A.; *et al.* Bone remodelling. *Brit J Orthod*, v.25, n.2, p.101-107, 1998.

HOFBAUER, L. C.; D. L. LACEY, C.R. DUNSTAN, T. C.SPELSBERG, B.L. RIGGS and S. KHOSLA. Interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α , but not

interleukin-6, stimulate osteoprotegerin ligand gene expression in human osteoblastic cells. *Bone*. 25:255–259, 1999.

HOFBAUER, L.C.; KHOSLA, S.; DUNSTRAN, C.R.; LACEY, D.L.; BOYLE, W.J.; RIGGS, B.L. The roles of osteoprotegerin and osteoprotegerin ligand in the paracrine regulator of bone resorption. *J Bone Miner Res*, v.15, n.1, p.2-12, 2000.

HOLLIDAY, L.S.; DEAN, A.D.; LIN, R.H.; GREENWALD, J.E.; GLUCK, S.L. Low NO concentrations inhibit osteoclast formation in mouse marrow cultures by cGMP-dependent mechanism. *Am J Physiol*, v.272, p.F283-F291, 1997.

HOLT, I.; DAVIE, M.W.J.; MARSHALL, M.J. Osteoclasts are not the major source of interleukin-6 in mouse parietal bone. *Bone*, v.18, p.221-226, 1996.

HOWELL, R.A. Bleaching discolored root – filled teeth. *Br Dent J*, v.148, p.159-162, 1980.

HUANG TH, DING SJ, HSU TC, KAO CT. Effects of mineral trioxide aggregate (MTA) extracts on mitogen-activated protein kinase activity in human osteosarcoma cell line (U2OS). *Biomaterials*. v. 24, n. 22, p.3909-13, 2003.

IALENT, A.; MONCADA, S.; DI ROSA, M. Modulation of adjuvant arthritis by endogenous nitric oxide. *Br J Pharmacol*, v.110, p.701-706, 1993.

JIMMI, E.; NAKAMURA, I.; IKEBE, T.; AKIYAMA, S.; TAKAHASHI, N.; SUDA, T. Activation of NF-kappaB is involved in the survival of osteoclasts promoted by interleukin-1. *J Biol Chem*, v.273, p.8799-8805, 1998.

KARRING, T.; NYMAN, S.; LINDHE, J.; SIRIRAT, M. Potentials for root resorption during periodontal wound healing. *J Clin Periodontol.*, v. 11, n. 1, p. 41-52, 1984.

KASTEN, T.P.; COLLIN-OSDOBY, P.; PATEL, N.; OSDOBY, P.; KRUKOWSKI, M.; MISKO, T.P.; SETTLE, S.; CURRIE, M.; NICKOLS, G. Potentiation of osteoclast bone-resorption activity by inhibition of nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci USA*, v.91, p.3569-3573, 1994.

KAWASHIMA, N.; STASHENKO, P. Expression of bone-resorptive and regulatory cytokines in murine periapical inflammation. *Arch Oral Biol.*, v. 44, n. 1, p. 55-66, 1999.

KEHOE, J.C. pH reversal following *in vitro* bleaching of pulpless teeth. *J Endod*, v.13, n.1, p.6-9, 1987.

KIMBLE, R.B.; SRIVASTAVA, S.; ROSS, F.P.; MATAYOSHI, A.; PACIFICI, R. Estrogen deficiency increases the ability of stromal cells to support murine osteoclastogenesis via an interleukin-1 and tumor necrosis factor-mediated stimulation of macrophage colony-stimulating factor production. *J Biol Chem*, v.271, p.2890-2897, 1996. In: CUZZOCREA, S.; *et al.* Inducible nitric oxide

synthase mediates bone loss in ovariectomized mice. *Endocrinol*, v.144, p.1098-1107, 2003.

KIRK, E.C. Sodium peroxide (Na₂O₂): a new dental bleaching agent and antiseptic. *Dent Cosmos*, v.35, n.2, p.192-198, 1893.

KIRK, E.C. The chemical bleaching teeth. *Dent Cosmos*, v.3, p.273-283, 1889.

KOBAYASHI, K.; TAKAHASHI, N.; JIMI, E.; UDAGAWA, N.; TAKAMI, M.; KOTAKE, S.; NAKAGAWA, N.; KINOSAKI, M.; YAMAGUCHI, K.; SHIMA, N.; YASUDA, H.; MORINAGA, T.; HIGASHIO, K.; MARTIN, T.J.; SUDA, T. Tumor necrosis factor alpha stimulates osteoclast differentiation by a mechanism independent of the ODF/RANKL-RANK interaction. *J Exp Med*, v.191, p.275-286, 2000.

KOH ET, TORABINEJAD M, PITT FORD TR, BRADY K, MCDONALD F. Mineral trioxide aggregate stimulates a biological response in human osteoblasts. *J Biomed Mater Res*.v. 37, n. 3, p. 432-9, 1997.

KOH ET, MCDONALD F, PITT FORD TR, TORABINEJAD M. Cellular response to Mineral Trioxide Aggregate. *J Endod*. v. 24, n. 8, p. 543-7, 1998.

KOHARA, H.; KITaura, H.; FUJIMURA, Y.; YOSHIMATSU, M.; MORITA, Y.; EGUCHI, T.; MASUYAMA, R.; YOSHIDA, N. IFN- γ directly inhibits TNF- α -induced osteoclastogenesis in vitro and in vivo and induces apoptosis mediated by Fas/Fas ligand interactions. *Immunol Lett*., v. 137, n. 1-2, p. 53-61, 2011.

KOJIRO SATO, AYAKO SUEMATSU, KAZUO OKAMOTO, AKIRA YAMAGUCHI, YASUYUKI MORISHITA, YUHO KADONO, SAKAE TANAKA, TATSUHIKO KODAMA, SHIZUO AKIRA, YOICHIRO IWAKURA, DANIEL J. CUA and HIROSHI TAKAYANAGI. Th17 functions as an osteoclastogenic helper T cell subset that links T cell activation and bone destruction. *J Exper Med* Vol. 203, No. 12, p. 2673–2682, 2006.

KOMINE, M.; KUKITA, A.; KUKITA, T.; OGATA, Y.; HOTOKEBUCHI, T.; KOHASHI, O. Tumor necrosis factor-alpha cooperates with receptor activator of nuclear factor kappaB ligand in generation of osteoclasts in stromal cell-depleted rat bone marrow cell culture. *Bone*, v. 28, n. 5, p. 474-483, 2001.

KONG, Y.Y.; FEIGE, U.; SAROSI, I.; BOLON, B.; TAFURI, A.; MORONY, S.; CAPARELLI, C.; LI, J.; ELLIOTT, R.; MCCABE, S.; WONG, T.; CAMPAGNUOLO, G.; MORAN, E.; BOGOCH, E.R.; VAN, G.; NGUYEN, L.T.; OHASHI, P.S.; LACEY, D.L.; FISH, E.; BOYLE, W.J.; PENNINGER, J.M. Activated T cells regulate bone loss and joint destruction in a adjuvant arthritis through osteoprotegerin ligand. *Nature*, v.402, p.304-309, 1999.

KONG, Y.-Y.; YOSHIDA, H.; SAROSI, I.; TAN, H.-L.; TIMMS, E.; CAPPARELLI, C.; MORONY, S.; ANTONIO, J.; SANTOS, O.; VAN, G.; ITIE, A.; KHOO, W.; WAKEHAM, A.; DUNSTAN, C.; LACEY, D.; MAK, T.; BOYLE, W.;

PENNINGER, J. OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. *Nature*, v.397, p.315-323, 1999.

KÖNIG, A.; MUHLBAUER, R.C.; FLEISCH, H. Tumor necrosis factor alpha and interleukin-1 stimulate bone resorption in vivo as measured by urinary [³H] tetracycline excretion from prelabeled mice. *J Bone Miner Res*, v.3, p.621-627, 1988.

KOTAKE, S.; SATO, K.; KIM, K.J.; TAKAHASHI, N.; UDAGAWA, N.; NAKAMURA, I.; *et al.* Interleukin-6 and soluble interleukin-6 receptors in the synovial fluids rheumatoid arthritis patients are responsible for osteoclast-like cell formation. *J Bone Miner Res*, v.11, p.88-95, 1996.

KOTAKE, S., N. UDAGAWA, N. TAKAHASHI, K. MATSUZAKI, K. ITOH, S. ISHIYAMA, S. SAITO, K. INOUE, N. KAMATANI, M.T. GILLESPIE, *et al.* IL-17 in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis is a potent stimulator of osteoclastogenesis. *J. Clin. Invest.* 103: 1345–1352, 1999.

KOULAOUZIDOU, E.; LAMBRIANIDIS, T.; BELTES, P.; LYROUDIA, K.; PAPADOPOULOS, C. Role of cemento-enamel junction on the radicular penetration of 30% hydrogen peroxide during intracoronary bleaching in vitro. *Endod Dent Traumatol*, v.12, n.3, p.146-150, 1996.

KRIFKA S, PETZEL C, HILLER KA, FRANK EM, BOSL C, SPAGNUOLO G, REICHL FX, SCHMALZ G, SCHWEIKL H. Resin monomer-induced differential activation of MAP kinases and apoptosis in mouse macrophages and human pulp cells. *Biomaterials*. v. 31, n.11, p. 2964-75. 2010.

KUHIHARA, N.; BERTOLINI, D.; SUDA, T.; AKIYAMA, Y.; ROODMAN, G.D. IL-6 stimulates osteoclast-like multinucleated cell formation in long term human marrow cultures by inducing IL-1 release. *J Immunol*, v.144, p.4226-4230, 1990.

KUROKOUCHI, K.; KAMBE, F.; YASUKAWA, K.; IZUMI, R.; ISHIGURO, N.; IWATA, H.; SEO, H. TNF-alpha increases expression of IL-6 and ICAM-1 genes through activation of NF-kappaB in osteoblast-like ROS17/2.8 cells. *J Bone Miner Res.*, v.13, n., 8, p. 1290-1299, 1998.

LACERDA, A.G.; NISHIYAMA, C.K.; SOUZA JR, M.H.S.; FRACISCHONE, C.E.; ISHIKIRIAMA, A. Clareamento de dentes: técnica alternativa usando aparelho de ultrassom. *RGO*, v.34, n.8, p.493-496, 1986.

LACEY, D. L.; TIMMS, E.; TAN, H. L.; KELLEY, M. J.; DUNSTAN, C. R.; BURGESS, T.; ELLIOTT, R.; COLOMBERO, A.; ELLIOTT, G.; SCULLY, S.; HSU, H.; SULLIVAN, J.; HAWKINS, N.; DAVY, E.; CAPPARELLI, C.; ELI, A.; QIAN, Y. X.; KAUFMAN, S., SAROSI, I.; SHALHOUB, V.; SENALDI, G.; GUO, J.; DELANEY, J.; BOYLE, W. J. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell.*, v.93, n.2, p. 165-176, 1998.

LACEY, D.L.; ERDMANN, J.M.; TEITELBAUM, S.L.; TAN, H.L.; OHARA, J.; SHIOI, A. Interleukin 4, interferon- γ , and prostaglandin E impact the osteoclastic cell-forming potential of murine bone marrow macrophages. *Endocrinol*, v. 136, p.2367-2376, 1995. In: CUZZOCREA, S.; *et al.* Inducible nitric oxide synthase mediates bone loss in ovariectomized mice. *Endocrinol*, v.144, p.1098-1107, 2003.

LADO, E.A.; STANLEY, H.R.; WEISMAN, M.I. Cervical resorption in bleached teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, v.55, p.78-80, 1983.

LAM, J.; NELSON, C. A.; ROSS, F. P.; TEITELBAUM, S. L., FREMONT, D. H. Crystal structure of the TRANCE/RANKL cytokine reveals determinants of receptor-ligand specificity. *J Clin Invest.*, v. 108, n. 7, p. 971-979, 2001.

LEE, S.K.; HUANG, H.; LEE, S.W.; KIM, K.H.; KIM, K.K.; KIM, H.-M.; LEE, Z.H.; KIM, H.-H. Involvement of iNOS-dependent NO production in the stimulation of osteoclast survival by TNF- α . *Expt Cell Res*, v.298, p.359-368, 2004.

LEFER, A.M. Nitric oxide: Nature's naturally occurring leukocyte inhibitor. *Circulation*, v.95, p.553-554, 1997.

LEONARD, R.H.; HAYWOOD, V.B.; PHILLIPS, C. Risk factors for developing tooth sensitivity and gingival irritation associated with nightguard vital bleaching. *Quintessence Int*, v.28,n.8,p.527-534, 1997.

LERNER, A.; STAHL, S.; STEIN, H. Hybrid external fixation in high-energy elbow fractures: a modular system with a promising future. *J Trauma*, v.49, n.6, p.1017-1022, 2000.

LI, Y. Toxicological considerations of tooth bleaching using peroxide – containing agents. *J Am Dent Assoc*, v.128 (suppl.), p.31S-36S, 1997.

LI, L.; KHANSARI, A.; SHAPIRA, L.; GRAVES, D. T.; AMAR, S.. Contribution of Interleukin-11 and Prostaglandin(s) in Lipopolysaccharide-Induced Bone Resorption In Vivo. *Infect Immun*, v.70, n. 7 p. 3915-3922, 2002.

LI, M. O., WAN, Y. Y., SANJABI, S., ROBERTSON, A. K., FLAVELL, R. A. Transforming growth factor-beta regulation of immune responses. *Annual Review of Immunology*, v. 24, p. 99-146, 2006.

LIM, M. Y.; LUM, S. O. Y.; POH, R. S. C.; LEE, G. P.; LIM, K. C. An in vitro comparison of the bleaching efficacy of 35% carbamide peroxide with established intracoronary bleaching agents. *International Endodontic Journal*, v. 37, n. 7, p. 483-488, 2004.

LOGUERCIO, A.D.; SOUZA, D.; FLOOR, A.S.; MESKO, M.; BARBOSA, A.N.; BUSATO, A.L.S. Avaliação clínica de reabsorção radicular externa em dentes desvitalizados submetidos ao clareamento. *Pesq Odont Bras*, v.16, n.2, Abr./Jun. 2002.

LOMAS-NEIRA J, PERL M, VENET F, CHUNG CS, AYALA A. The role and source of tumor necrosis factor- α in hemorrhage-induced priming for septic lung injury. Shock. 2012, v.37, n. 6, p. 611-20, 2012.

LORENZO, J.A.; NAPRTA, A.; RAO, Y.; ALANDER, C.; GLACCUM, M.; WIDMER, M.; GRONOWICZ, G.; KALINOWSKI, J.; PILBEAM, C.C. Mice lacking the type I interleukin-1 receptor do not lose bone mass after ovariectomy. Endocrinol, v.139, p.3022-3025, 1998.

LUBBERTS E, JOOSTEN LA, CHABAUD M, VAN DEN BERSSELAAR L, OPPERS B, COENEN-DE ROO CJ, RICHARDS CD, MIOSSEC P, VAN DEN BERG WB. IL-4 gene therapy for collagen arthritis suppresses synovial IL-17 and osteoprotegerin ligand and prevents bone erosion. J Clin Invest. v.105, n.12, p.1697-710, 2000.

MACINTYRE, I.; ZAIDI, M.; ALAM, A.S.; DATTA, H.K.; MOONGA, B.S.; LIDBURY, P.S.; HECKER, M.; VANE, J. Osteoclast inhibition: an action of nitric oxide not mediated by cyclic GMP. Proc Natl Acad Sci USA, v.88, p.2936-2940, 1991.

MADISON, S.; WALTON, R. Cervical root resorption following bleaching of endodontically treated teeth. J Endod, v.16, p.570, 1990.

MAKKES, P.C.; THODEN VAN VELZEN, S.K. Cervical external root resorption. J Dentist, v.3, p.217-222, 1975.

MARTIN, T. J.; SIMS, N. A. Osteoclast-derived activity in the coupling of bone formation to resorption. Trends Mol Med., v. 11, n. 2, p. 76-81, 2005.

MARUOTTI, N.; D'ONOFRIO, F.; CORRADO; A.; CANTATORE, F. P. Why TNF- α inhibition is not sufficient to avoid juxta-articular erosions in chronic arthritis? Intern Emerg Med., v.7, n.1, p. 15-20, 2012.

MEHRVARZ FAR , P.; DAHI-TALEGHANI, M.; SAGHIRI, M. A.; KARAMIFAR, K.; SHABABI, B.; BEHNIA, A. Comparison of MTA, Geristore® and Amalgam with or without Bioglass as a matrix in sealing the furcal perforations (*in vitro study*). The Saudi Dental Journal, v. 22, n. 3, p. 119-124, 2010.

MCCARTNEY-FRANCIS, N.L.; SONG, X.; MIZEL, D.E.; WAHL, S.M. Selective inhibition of inducible nitric oxide synthase exacerbates erosive joint disease. J Immunol, v.166, p.2734-2740, 2001.

MIOSSEC, P.; BRIOLAY, J.; DECHANET, J.; WIJDENES, J.; MARTINEZ-VALDEZ, H.; BANCHEREAU, J. Inhibition of the production of proinflammatory cytokines and immunoglobulins by interleukin-4 in an ex vivo model of rheumatoid synovitis. Arthritis Rheum. ,v. 35, n. 8, p. 874-883, 1992.

MIOSSEC, P.; CHOMARAT, P.; DECHANET, J.; MOREAU, J. F.; ROUX, J. P.; DELMAS, P.; BANCHEREAU, J. Interleukin-4 inhibits bone resorption through an effect on osteoclasts and proinflammatory cytokines in an ex vivo model of

bone resorption in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.*, v. 37, n. 12, p. 1715-1722, 1994.

MITCHELL PJ, PITT FORD TR, TORABINEJAD M, MCDONALD F. Osteoblast biocompatibility of mineral trioxide aggregate. *Biomaterials.* v. 20, n.2, p.167-73 1999.

MONCADA, S.; HIGGS, A. The L-arginine – nitric oxide pathway. *N Engl J Med*, v.329, p.2002-2012, 1993.

MONDELLI, J.; GALAN JR, J.; ISHIKIRIAMA, A.; CORADAZZI, J.L.; NAVARRO, M.F.L.; PEREIRA, J.C.; FRANCISCHONE, C.E.; FRANCO, E.B. *Restaurações Estéticas*. São Paulo: Editora Savier, 1984.

MOONGA BS, MOSS DW, PATCHELL A, ZAIDI M. Intracellular regulation of enzyme secretion from rat osteoclasts and evidence for a functional role in bone resorption. *J Physiol.* Oct;429, p.29-45, 1990.

MULSCH, A. NO synthases: mechanism of activation, identity of NOX and expression in human cells. *Res Immunol*, v.142, p.561-565, 1991.

MUNDY, G.R. Medical grand rounds: from the Dempsey hospital of the University of Connecticut. The pathogenesis and therapy of a case of malignant hypercalcemia. Case presentation. *Conn Med*, v.41, n.3, p.151-155, 1977.

NAKAE, S., A. NAMBU, K. SUDO, and Y. IWAKURA. Suppression of immune induction of collagen-induced arthritis in IL-17-deficient mice. *J. Immunol.* 171:6173–6177, 2003.

NATHAN, C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J*, v.6, p.3051-3064, 1992.

NYMAN, S.; GOTTLow, J.; LINDHE, J.; KARRING, T.; WENNSTROM, J. New attachment formation by guided tissue regeneration. *J Periodontal Res.*, v. 22, n. 3, p. 252-254, 1987.

NISHIGUCHI, M.; YUASA, K.; SAITO, K.; FUKUMOTO, E.; YAMADA, A.; HASEGAWA, T.; YOSHIZAKI, K.; KAMASAKI, Y.; NONAKA, K.; FUJIWARA, T.; FUKUMOTO, S. Amelogenin is a negative regulator of osteoclastogenesis via downregulation of RANKL, M-CSF and fibronectin expression in osteoblasts. *Arch Oral Biol.*, v. 52, n. 3, p. 237-243, 2007.

NISHIYAMA, C.K.; LACERDA, A.G.; SOUZA JÚNIOR M.H.; FRANCISCHONE C.E.; ISHIKIRIAMA, A.; BERBERT, A. Blanchiment des dents depulpees avec assistance ultrasonique. *Rev Fr Endod*, v.8, n.1, p.43-47, 1989.

NUTTING, E.B.; POE, G.S. A new combination for bleaching teeth. *J S Calif Dent Assoc*, v.31, p.289-291, 1963.

OIKARINEN, K.S.; STOLTZE, K.; ANDREASEN, J. O. Influence of conventional forceps extraction and extraction with an extrusion instrument on cementoblast loss and external root resorption of replanted monkey incisors. J Periodontal Res., v. 31, n. 5, p. 337-344, 1996.

PAIVA, J.G.; ANTONIAZZI, J.H. Clareamento dental. In: Endodontia – bases para prática clínica. 2 ed., São Paulo: Artes Médicas, 1988, cap.32, p.759-77.

PALMER, R.M.; FERRIGE, A.M.; MONCADA, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium – derived relaxing factor. Nature, v.327, p.524-526, 1987.

PARK-MIN, K. H.; JI, J. D.; ANTONIV, T.; REID, A. C.; SILVER, R. B.; HUMPHREY, M. B.; NAKAMURA, M.; IVASHKIV, L. B. IL-10 suppresses calcium-mediated costimulation of receptor activator NF-kappa B signaling during human osteoclast differentiation by inhibiting TREM-2 expression. J Immunol., v. 183, n. 4, p. 2444-2455, 2009.

PASHLEY, D.H.; KEPLER, E.E.; WILLIAMS, E.C.; OKABE, A. The effects of acid etching on the in vivo permeability of dentine in the dog. Arch Oral Biol, v.28, n.7, p.555-559, 1983.

PASHLEY, D.H.; MICHELCH, V.; KEHL, T. Dentin permeability: effects of smear layer removal. J Prosthet Dent, v.46, n.5, p.531-537, 1981.

PATEL, S.; DAWOOD, A. The use of cone beam computed tomography in the management of external cervical resorption lesions. Int Endod J., v. 40, n. 9, p. 730-737, 2007.

PATEL, S.; KANAGASINGAM, S.; PITT FORD, T. External cervical resorption: a review. J Endod., v. 35, n. 5, p. 616-625, 2009.

PÉCORA, J.D.; SOUZA NETO, M.D.; COSTA, W.F. Apresentação de um método químico que revela *in vitro* a passagem do peróxido de hidrogênio a 30% através da dentina radicular. Rev Paul Odontol, v.13,, n.2, p.34-36, 1991.

PEREZ-AMODIO, S.; JANSEN, D. C.; SCHOENMAKER, T.; VOGELS, I. M.; REINHECKEL, T.; HAYMAN, A. R.; COX, T. M.; SAFTIG, P.; BEERTSEN, W.; EVERTS, V. Calvarial osteoclasts express a higher level of tartrate-resistant acid phosphatase than long bone osteoclasts and activation does not depend on cathepsin K or L activity. Calcif Tissue Int., v. 79, n. 4, p. 245-254, 2006.

PEREZ-AMODIO, S.; JANSEN, D. C.; TIGCHELAAR-GUTTER, W.; BEERTSEN, W.; EVERTS, V. Endocytosis of tartrate-resistant acid phosphatase by osteoblast-like cells is followed by inactivation of the enzyme. Calcif Tissue Int., v. 78, n. 4, p. 248-254, 2006.

PI SH, KIM SC, KIM HT, LEE HJ, LEE SK, KIM EC. Defense mechanism of heme oxygenase-1 against cytotoxic and receptor activator of nuclear factor-

kappaB ligand inducing effects of hydrogen peroxide in human periodontal ligament cells. J Periodontal Res. v42 n. 4, p.331-9, 2007.

PIRES, L.C.M. Reabsorção radicular externa. In: Clareamento com gel em despolpado. São Paulo: Santos, 2003, cap.4, p.21-23.

RAGAB, A. A.; NALEPKA, J. L.; BI, Y.; GREENFIELD, E. M. Cytokines synergistically induce osteoclast differentiation: support by immortalized or normal calvarial cells. Am J Physiol Cell Physiol., v. 283, n. 3, p. 679-687, 2002.

RALSTON, S.H.; HO, L.P.; HELFRICH, M.H.; GRABOWSKI, P.S.; JOHNSTON, P.W.; BENJAMIN, N. Nitric oxide: a cytokine-induced regulator of bone resorption. J Bone Miner Res, v.10, p.1040-1049, 1995.

RESILLEZ-URIOSTE, F.; SANANAJT, K.; DAVIDSON, R. M. Use of a resin-ionomer in the treatment of mechanical root perforation: report of a case. Quintessence Int., v. 29, n. 2, p. 115-118, 1998.

REZENDE, T. M.; VIEIRA, L. Q.; CARDOSO, F. P.; OLIVEIRA, R. R.; DE OLIVEIRA MENDES, S. T.; JORGE, M. L.; RIBEIRO SOBRINHO, A. P. The effect of mineral trioxide aggregate on phagocytic activity and production of reactive oxygen, nitrogen species and arginase activity by M1 and M2 macrophages. Int Endod J., v. 40, n. 8, p. 603-611, 2007.

REZENDE, T. M.; VIEIRA, L. Q.; SOBRINHO, A. P.; OLIVEIRA, R. R.; TAUBMAN, M. A.; KAWAI, T. The influence of mineral trioxide aggregate on adaptive immune responses to endodontic pathogens in mice. J Endod., v. 34, n. 9, p. 1066-1071, 2008.

RIKSEN EA, PETZOLD C, BROOKES S, LYGSTADAAS SP, RESELAND JE. Human osteoblastic cells discriminate between 20-kDa amelogenin isoforms. Eur J Oral Sci. v. 119, n.1, p. 357-65, 2011.

ROODMAN, G. D. Advances in bone biology: the osteoclast. Endocr Rev., v. 17, n. 4, p. 308-332, 1996.

ROODMAN, G. D. Paget's disease and osteoclast biology. Bone, v. 19, n. 3, p. 209-212.

ROTSTEIN, I. Clareamento em dentes vitais e não vitais. In: COHEN, S.; BURNS, R.C. – Caminhos da polpa. 7 ed., São Paulo: Guanabara Koogan, 2000, cap.20, p.637-652.

ROTSTEIN, I. et al. *In vitro* efficacy of sodium perborate preparations used for intracoronal bleaching of discolored non-vital teeth. Endod Dent Traumatol, v.1, p.177-1991.

ROTSTEIN, I. *In vitro* determination and quantification of 30% hydrogen peroxide penetration through dentine and cementum during bleaching. Oral Surg Oral Med Oral Pathol, v.72, p.602-606, 1991.

ROTSTEIN, I. Role of catalase in the elimination of residual hydrogen peroxide following tooth bleaching. J Endod, v.19, n.11, p.567-569, 1993.

ROTSTEIN, I.; FRIENDMAN, S.; MOR, C.; KATZNELSON, J.; SOMMER, M.; BAB, I. Histological characterization of bleaching – induced external root resorption in dogs. J Endod, v.17, p.436-441, 1991.

ROTSTEIN, I.; MOR, C.; FRIEDMAN, S. Prognosis of intracoronal bleaching with sodium perborate preparations in vitro: 1 – year study. J Endod, v.19, n.1, p.10-12, 1993.

ROTSTEIN, I.; TOREK, Y.; MISGAV, R. Effect of cementum defects on radicular penetration of 30% H₂O₂ during intracoronal bleaching. J Endod, v.17, p.230-233, 1991.

SAHARA, N.; TOYOKI, A.; ASHIZAWA, Y.; DEGUCHI, T.; SUZUKI, K. Cytodifferentiation of the odontoclast prior to the shedding of human deciduous teeth: an ultrastructural and cytochemical study. Anat Rec., v. 244, n.1, p. 33-49, 1996.

SAKAGUCHI, R.L.; HAMPEL, A.T. Bleaching of vital teeth. Clin Dent, p.1-10, 1991.

SAIDENBERG-KERMANAC'H N, CORRADO A, LEMEITER D, DEVERNEJOU MC, BOISSIER MC, COHEN-SOLAL ME. TNF-alpha antibodies and osteoprotegerin decrease systemic bone loss associated with inflammation through distinct mechanisms in collagen-induced arthritis. Bone. V.35, n.5, p.1200-7, 2004.

SAIDENBERG-KERMANAC'H N, BESSIS N, LEMEITER D, DE VERNEJOU MC, BOISSIER MC, COHEN-SOLAL M. Interleukin-4 cellular gene therapy and osteoprotegerin decrease inflammation-associated bone resorption in collagen-induced arthritis. J Clin Immunol.v.24, n.4, p.370-8, 2004.

SAQUY, P.C.; SOUZA NETO, M.D.; CANEPA, R.; PÉCORA, J.D. Estudo *in vitro* da permeabilidade dentinária após aplicação de agentes clareadores. Rev Paul Odontol, v.14, p.37-40, 1992.

SATO, K.; TAKAYANAGI, H. Osteoclasts, rheumatoid arthritis, and osteoimmunology. Curr Opin Rheumatol., v.18, n. 4, p.419-326, 2006.

SCHINDELMEISER, J.; SCHEWE, P.; ZONKA, T.; MÜNSTERMANN, D. Histochemical and immunological demonstration of purple acid phosphatase in human and bovine alveolar macrophages. Histochemistry, v. 92, n. 1, p. 81-85, 1989.

SILVEIRA, F.F.; BERGER, C.R. Clareamento em dentes sem vitalidade pulpar. In: BERGER, C.R. et al. Endodontia. São Paulo: Pancast, 1998, cap.33, p.625-632.

STASHENKO, P.; TELES, R.; D'SOUZA, R. Periapical inflammatory responses and their modulation. *Crit Rev Oral Biol Med.*, v. 9, n. 4, p. 498-521, 1998.

STEEVE, K.T.; MARC, P.; SANDRINE, T.; DOMINIQUE, H.; YANNICK, F. IL-6, RANKL, TNF-alpha/IL-1: interrelations in bone resorption pathophysiology. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, v.15, p.49-60, 2004.

STEJSKAL D, BARTEK J, PASTORKOVÁ R, RŮZICKA V, ORAL I, HORALÍK D. Osteoprotegerin, RANK, RANKL. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* v.145, n. 2, p. 61-4, 2001.

STICHTENOTH, D.; FRÖLICH J. Nitric oxide and inflammatory joint diseases. *Br J Rheumatol* v.37, p.246-257, 1998.

SUDA, T.; TAKAHASHI, N.; UDAGAWA, N.; JIMI, E.; GILLESPIE, M.T.; MARTIN, T.J. Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. *Endocr Rev*, v.20, p.345-357, 1999.

SUGIYAMA, E.; KURODA, A.; HORI, F.; HORI, T.; TAKI, H.; ARAI, N.; KOBAYASHI, M. Serum Interleukin-6 Level is a Sensitive Parameter of Disease Activity in Rheumatoid Arthritis. *J Clin Rheumatol.*, v. 1, n. 2, p. 93-98, 1995.

SUNYER, T.; ROTHE, L.; JIANG, X.; OSDOBY, P.; COLLIN-OSDOBY, P. Proinflammatory agents, IL-8 and IL-10, upregulated inducible nitric oxide synthase expression and nitric oxide production in avian osteoclast-like cells. *J Cell Biochem*, v.60, p.469-483, 1996.

TAGUCHI, Y.; YAMAMOTO, M.; YAMATE, T.; LIN, S.C.; MORCHALA, H.; DE TOGNI, P.; *et al.* Interleukin-6-type cytokines stimulates mesenchymal progenitor differentiation toward the osteoblastic lineage. *Proc Assoc Am Phys*, v.110, p.559-574, 1998.

TAKAYANAGI, H., K. OGASAWARA, S. HIDA, T. CHIBA, S. MURATA, K. SATO, A. TAKAOKA, T. YOKOCHI, H. ODA, K. TANAKA, *et al.* T-cell-mediated regulation of osteoclastogenesis by signalling cross-talk between RANKL and IFN- γ . *Nature*. 408:600–605, 2000.

TAKAYANAGI, H.; SATO, K; TAKAOKA, A.; TANIGUCHI, T. Interplay between interferon and other cytokine systems in bone metabolism. *Immunol Rev.*, v. 208, p. 181-193, 2005.

TAKI H, SUGIYAMA E, KURODA A, MINO T, KOBAYASHI M. Interleukin-4 inhibits interleukin-11 production by rheumatoid synovial cells. *Rheumatology (Oxford)*. V. 39, n. 7, p. 728-31, 2000.

TEITELBAUM, S.L.; STEWART, C.C.; KAHN, A.J.; Rodent peritoneal macrophages as bone resorbing cells. *Calcif Tissue Int*, v.27, n.3, p.255-261, 1979.

TEITELBAUM, S.L. Bone resorption by osteoclasts. *Science*, n.289, p.1504-1508, 2000.

TEITELBAUM, S. L.; ROSS, F. P. Genetic regulation of osteoclast development and function. *Nat Rev Genet.*, v.4, n.8, p. 638-649, 2003.

TEIXEIRA, F.B.; NOGUEIRA, E.C.; FERRAZ, C.C.R.; ZAIA, A.A.A. *Rev APCD*, v.54, n.4, Jul./Ago. 2000.

TERMINE, J. D.; BELCOURT, A. B.; CHRISTNER, P. J.; CONN, K. M.; NYLEN, M. U. Properties of dissociatively extracted fetal tooth matrix proteins. I. Principal molecular species in developing bovine enamel. *J Biol Chem.*, v. 255, n. 20, p. 9760-8768, 1980.

THOMSON, B.M.; MUNDY, G.R.; CHAMBERS, T.J. Tumor necrosis factors alpha and beta induce osteoblastic cells to stimulate osteoclastic bone resorption. *J Immunol*, v.138, p.775-779, 1987.

TITLLEY, K.C.; TORNECK, C.D.; SMITH, D.C. The effect of concentrated hydrogen peroxide solutions on the surface morphologicay of human tooth enamel. *J Endod*, v.14, n.2, p.69-74, 1988.

TORABINEJAD, M.; HONG, C. U.; PITT FORD, T. R.; KAIYAWASAM, S. P. Tissue reaction to implanted super-EBA and mineral trioxide aggregate in the mandible of guinea pigs: a preliminary report. *J Endod.*, v. 21, n. 11, p. 569-571, 1995.

TORABINEJAD, M.; HONG, C. U.; PITT FORD, T. R.; KETTERING, J. D. Cytotoxicity of four root end filling materials. *J Endod.*, v. 21, n. 10, p. 489-492, 1995.

TORABINEJAD, M.; HONG, C. U.; MCDONALD, F.; PITT FORD, T. R. Physical and chemical properties of a new root-end filling material. *J Endod.* v. 21, n. 7, p. 349-353, 1995.

TORABINEJAD, M., CHIVIAN, N. Clinical applications of mineral trioxide aggregate. *J Endod.*, v. 25, n. 3, p. 197-205, 1999.

TORABINEJAD, M.; PARIROKH, M. Mineral trioxide aggregate: a comprehensive literature review--part II: leakage and biocompatibility investigations. *J Endod.*, v. 36, n. 2, p. 190-202, 2010.

TORCIA, M.; LUCIBELLO, M.; VANNIER, E.; FABIANI, S.; MILIANI, A.; GUIDI, G.; SPADA, O.; DOWER, S.K.; SIMS, J.E.; SHAW, A.R.; *et al.* Modulation of osteoclast-activating factor activity of multiple myeloma bone marrow cells by different interleukin-1 inhibitors. *Exp Hematol*, v.24, p.868-874, 1996.

TRACEY, K. J.; CERAMI, A. Tumor necrosis factor: an updated review of its biology. *Crit Care Med*, v.21, n.10, p. 415-422, 1993.

TRACEY, K. J., CERAMI, A. Tumor necrosis factor, other cytokines and disease. *Annu Rev Cell Biol*, v.9, p. 317-343, 1993.

TRONSTAD, L. Root resorption – etiology, terminology and clinical manifestations. *Endod Dent Traumatol*, v.4, p.241-252, 1988.

TROPE, M. Cervical root resorption. *J Am Dent Assoc*, v.128, p.56-59, 1997.

TRUMAN, J. Bleaching teeth. *Dent Cosmos*, v.23, n.6, p.281-288, 1881.

TSUKAHARA, H.; MIURA, M.; TSUCHIDA, S.; HATA, I.; YAMAMOTO, K.; ISHII, Y.; MURAMATSU, I.; SUDO, M. Effect of nitric oxide synthase inhibitors on bone metabolism in growing rats. *Am J Physiol*, v.270, p.E840-845, 1996.

UDAGAWA, N.; TAKAHASHI, N.; KATAGIRI, T.; TAMURA, T.; WADA, S.; FINLAY, D.M.; *et al.* Interleukin (IL-6) induction of osteoclast differentiation depends on IL-6 receptors expressed on osteoblastic cells but not on osteoclast progenitors. *J Exp Med*, v.182, p.1461-1468, 1995.

UDAGAWA, N.; TAKAHASHI, N.; KATAGIRI, T.; TAMURA, T.; WADA, S.; FINLAY, D. M.; MARTIN, T. J.; HIROTA, H.; TAGA, T.; KISHIMOTO, T.; SUDA, T. Interleukin (IL)-6 induction of osteoclast differentiation depends on IL-6 receptors expressed on osteoblastic cells but not on osteoclast progenitors. *J Exp Med.*, v.182, n. 5, p. 1461-1468, 1995.

VAN'T HOF, R.J.; RALSTON, S.H. Cytokine-induced nitric oxide inhibits bone resorption by inducing apoptosis of osteoclast progenitors and suppressing osteoclast activity. *J Bone Miner Res*, v.12, p.1797-1804, 1997.

VAN'T HOF, R.J.; RALSTON, S.H. Nitric oxide and bone. *Immunol*, v.103, p.255-261, 2001.

VERMEIRE, K.; HEREMANS, H.; VANDEPUTTE, M.; HUANG, S.; BILLIAU, A.; MATTHYS, P. Accelerated collagen-induced arthritis in IFN-gamma receptor-deficient mice. *J Immunol.*, v. 158, n. 11, p. 5507-5513, 1997.

WANG, Z.; MCCAULEY, L. K. Osteoclasts and odontoclasts: signaling pathways to development and disease. *Oral Dis.*, v.17, n.2, p. 129-142, 2010.

WATKINS, S.; MACAULAY, W.; TURNER, D.; *et al.* Identification of inducible nitric oxide synthase in human macrophages surrounding loosened hip prostheses. *Am J Pathol*, Apr., v.150, p.1199-1205, 1997.

WATTS, A.; ADDY, M. Tooth discolouration and staining: a review of the literature. *Br Dent J.*, v. 24, n. 6, p. 309-316, 2001.

WEIGER, R.; KUHN, A.; LÖST, C. Effect of various types of sodium perborate on the pH of bleaching agents. *J Endod*, v.19, n.5, p.239-241, 1993.

WESTLAKE, A. Bleaching teeth by electricity. *Am J Dent Sci*, v.29, p.101, 1895.

WEAVER, C.T.; HARRINGTON, L. E.; MANGAN, P.R.; GAVRIELI, M.; MURPHY, K.M. Th17: an effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties. *Immunity*, v. 24, n.6, p. 677–688, 2006.

WEI, S.; WANG, M. W.; TEITELBAUM, S. L.; ROSS, F. P. Interleukin-4 reversibly inhibits osteoclastogenesis via inhibition of NF-kappa B and mitogen-activated protein kinase signaling. *J Biol Chem.*, v. 277, n. 8, p. 6622-6630, 2002.

WEI H, ZHENG X, LOU D, ZHANG L, ZHANG R, SUN R, TIAN Z. Tumor-induced suppression of interferon-gamma production and enhancement of interleukin-10 production by natural killer (NK) cells: paralleled to CD4+ T cells. *Mol Immunol.* v. 42, n. 9, p. 1023-31. 2005.

WIEGAND, A.; ATTIN, T. Efficacy of enamel matrix derivatives (Emdogain) in treatment of replanted teeth--a systematic review based on animal studies. *Dent Traumatol.*, v. 24, n. 5, p. 498-502, 2008.

WONG, B. R.; JOSIEN, R.; LEE, S. Y.; SAUTER, B.; LI, H. L.; STEINMAN, R. M.; CHOI, Y. TRANCE (tumor necrosis factor [TNF]-related activation-induced cytokine), a new TNF family member predominantly expressed in T cells, is a dendritic cell-specific survival factor. *J Exp Med.*, v. 186, n. 12, p. 2075-2080, 1997.

WONG, M.; OAKLEY, S. P.; YOUNG, L.; JIANG, B. Y.; WIERZBICKI, A.; PANAYI, G.; CHOWIENCZYK, P.; KIRKHAM, B. Infliximab improves vascular stiffness in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.*, v. 68, n.8, v. 1277-1284, 2009.

WOODS JM, KATSCHKE KJ, VOLIN MV, RUTH JH, WOODRUFF DC, AMIN MA, CONNORS MA, KURATA H, ARAI K, HAINES GK, KUMAR P, KOCH AE. IL-4 adenoviral gene therapy reduces inflammation, proinflammatory cytokines, vascularization, and bony destruction in rat adjuvant-induced arthritis. *J Immunol.* v. 166, n. 2, p. 1214-22, 2001.

YAGI, Y.; SUDA, N.; YAMAKOSHI, Y.; BABA, O.; MORIYAMA, K. In vivo application of amelogenin suppresses root resorption. *J Dent Res.*, v. 88, n. 2, p. 176-181, 2009.

YASUI, T.; KADONO, Y.; NAKAMURA, M.; OSHIMA, Y.; MATSUMOTO, T.; MASUDA, H.; HIROSE, J.; OMATA, Y.; YASUDA, H.; IMAMURA, T.; NAKAMURA, K.; TANAKA, S. Regulation of RANKL-induced osteoclastogenesis by TGF- β through molecular interaction between Smad3 and Traf6. *J Bone Miner Res.*, v. 26, n. 7, p. 1447-1456, 2011.

YILMAZ, S.; CAKAR, G.; YILDIRIM, B.; SCULEAN, A. Healing of two and three wall intrabony periodontal defects following treatment with an enamel matrix derivative combined with autogenous bone. *J Clin Periodontol.*, v. 37, n. 6, p. 544-550, 2010.

ZAIDI M, MOONGA B, MOSS DW, MACINTYRE I. Inhibition of osteoclastic acid phosphatase abolishes bone resorption. *Biochem Biophys Res Commun*. V. 28;159(1) p. 68-71, 1989.

ZALKIND, M.; ARWAZ, J.R.; GOLDMAN, A.; ROTSTEIN, I. Surface morphology changes in human enamel, dentin and cementum following bleaching: a scanning electron microscopy study. *Endod Dent Traumatol*, v.12, n.2, p.82-88, 1996.

ZANIN, F.; BRUGNERA JR. *Clareamento dental com luz-laser*. 2 ed., São Paulo: Santos, 2004, cap.9, p.77-80.

ZARAGOZA, V.M.T. Bleaching of vital teeth: technique. *EstoModeo*, v.9, p.7, 1984.

ZHENG H, YU X, COLLIN-OSDOBY P. RANKL stimulates inducible nitric-oxide synthase expression and nitric oxide production in developing osteoclasts. An autocrine negative feedback mechanism triggered by RANKL-induced interferon-beta via NF-kappaB that restrains osteoclastogenesis and bone resorption. *J Biol Chem*. v. 9, n. 23, p. 15809-20, 2006.

ZOU, W.; HAKIM, I.; TSCHOEP, K.; ENDRES, S.; BAR-SHAVIT, Z. Tumor necrosis factor-alpha mediates RANK ligand stimulation of osteoclast differentiation by an autocrine mechanism. *J Cell Biochem*, v.83, p.70-83, 2001.