



CENTRO UNIVERSITÁRIO CHRISTUS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
MESTRADO ACADÊMICO EM CIÊNCIAS ODONTOLÓGICAS

MARCÍLIO RODRIGUES PINTO

**PAPEL DA ÓXIDO NÍTRICO SINTASE INDUZIDA NA NOCICEPÇÃO E
DESCONFORTO OROFACIAL EM RATAS SUBMETIDAS A
CLAREAMENTO DENTAL COM PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO**

FORTALEZA

2021

MARCÍLIO RODRIGUES PINTO

PAPEL DA ÓXIDO NÍTRICO SINTASE INDUZIDA NA NOCICEPÇÃO E
DESCONFORTO OROFACIAL EM RATAS SUBMETIDAS A CLAREAMENTO
DENTAL COM PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Odontologia do Centro Universitário Christus como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Odontológicas.

Área de concentração: Clínica Odontológica

Linha de Pesquisa: Biomateriais

Orientador: Prof. Fabrício Bitu Sousa

Coorientador: Prof. Dr. Paulo Goberlânio de Barros Silva

Colaboradores: Karine Cestaro Mesquita, Maria
Marcela Borges, Kirlya Isabel da Silva Medeiros,
Letícia Menezes Maia.

FORTALEZA
2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Centro Universitário Christus - Unichristus
Gerada automaticamente pelo Sistema de Elaboração de Ficha Catalográfica do
Centro Universitário Christus - Unichristus, com dados fornecidos pelo(a) autor(a)

P659p Pinto, Marcílio Rodrigues.
PAPEL DA ÓXIDO NÍTRICO SINTASE INDUZIDA NA
NOCICEPÇÃO E DESCONFORTO OROFACIAL EM RATAS
SUBMETIDAS A CLAREAMENTO DENTAL COM PERÓXIDO
DE HIDROGÊNIO : Estudo em animal (in vivo) / Marcílio
Rodrigues Pinto. - 2021.
34 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Centro Universitário Christus -
Unichristus, Mestrado em Ciências Odontológicas, Fortaleza, 2021.
Orientação: Prof. Dr. Fabrício bitu souza .
Coorientação: Prof. Dr. Paulo Goberlanio de Barros Silva .

1. Nocicepção . 2. Clareamento dental. 3. Óxido nítrico . I. Título.

CDD 617.6

MARCÍLIO RODRIGUES PINTO

PAPEL DA ÓXIDO NÍTRICO SINTASE INDUZIDA NA NOCICEPÇÃO E
DESCONFORTO OROFACIAL EM RATAS SUBMETIDAS A CLAREAMENTO
DENTAL COM PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO

Dissertação de Mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas do Centro Universitário Christus como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Odontológicas. Área de concentração: Clínica Odontológica. Linha de Pesquisa: Biomateriais
Orientador: Prof. Fabrício Bitu Sousa
Co-orientador: Prof. Dr. Paulo Goberlânio de Barros Silva

Aprovado em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Fabrício Bitu Sousa (Presidente)
(Centro Universitário Christus)

Prof. Dr. Paulo Goberlânio de Barros Silva
(Centro Universitário Christus)

Prof. Dra. Ana Paula Negreiros Nunes Alves
(Universidade Federal do Ceará)

AGRADECIMENTOS

À **Deus**, presença constante em minha vida, minha fonte inesgotável de força e fé, sem ele nada seria possível.

Aos meus pais, **José Antônio de Mesquita Pinto e Maria Suely Rodrigues Pinto**, que torcem e vibram por cada conquista minha desde sempre, obrigado pelos exemplos de amor, ética, perseverança e de família. À minha esposa, **Dra. Daniela Nunes Pinto**, que me incentivou e me ajudou não apenas com seus conhecimentos de docente mas principalmente pela sua dedicação e amor a nossa família.

As minhas filhas, **Maria Eduarda Nunes Pinto e Leticia Maria Nunes Pinto**, minhas jóias raras a quem amo de maneira incondicional.

Ao meu irmão, **Dr. Mardônio Rodrigues Pinto**, quem primeiro me apresentou a odontologia.

À minha cunhada, **Profa. Dra. Ana Paula Negreiros Nunes Alves**, fonte de inspiração e orgulho.

Ao meu orientador, **Prof. Dr Fabrício Bitu Sousa**, pela disponibilidade, empenho e colaboração neste trabalho.

Ao meu co-orientador, **Prof. Dr. Paulo Goberlanio de Barros Silva**, por toda a paciência e simplicidade em compartilhar seus conhecimentos, característica que só os grandes mestres possuem.

A **Profa Dra Karine Cestaro Mesquita**, sua colaboração foi fundamental.

As minhas colegas de laboratório, as discentes: Maria Marcela Borges, Kirlya Isabel da Silva Medeiros e Letícia Menezes Maia que não mediram esforços na condução dessa pesquisa.

A minha colega dentista e também mestranda **Monalisa Vasconcelos** por toda sua ajuda.

Aos meus **colegas de mestrado**, turma animada, cujo apoio e amizade estiveram presentes em todos os momentos.

A todos os **professores** do curso de Mestrado em Ciências Odontológicas do **Centro Universitário Christus**, pela contribuição na minha formação acadêmica.

RESUMO

O peróxido de hidrogênio apresenta efeitos deletérios aos tecidos dentais, ocasionando dor e sensibilidade em muitos pacientes submetidos ao clareamento, em decorrência do estresse oxidativo e da inflamação induzida por este composto. O óxido nítrico (ON) é uma das mais importantes espécies reativas de oxigênio para indução de toxicidade mediada por células fagocitárias, que sintetizam o ON por meio da óxido nítrico sintase induzida (iNOS). Diante disso, o presente estudo teve por objetivo avaliar o papel da iNOS na nocicepção e desconforto orofacial em ratas submetidas a clareamento dental com peróxido de hidrogênio a 35%. Para tanto, utilizaram-se 72 ratas da linhagem Wistar que foram aleatoriamente divididos em três grupos experimentais: um grupo sham submetido à simulação do tratamento clareador e tratado com salina, um grupo controle submetido ao tratamento clareador e tratado com salina e um grupo teste submetido a tratamento clareador e bloqueio farmacológico da iNOS com aminoguanidina (AG). Os animais foram pesados diariamente ao longo do protocolo experimental. Após 24h, 48h e 7 dias, os animais foram eutanasiados por sobredose anestésica e coletados os gânglios trigeminiais bilaterais para processamento e análise histológica. Os animais eutanasiados após sete dias foram submetidos a estudo de comportamento diariamente até o dia de eutanásia (escalas de Grimace e somatório do número de coçadas e mordidas). Após análise de comportamento, foi realizado o ensaio de nocicepção, usando filamentos de fibra de Von Frey de um analgesímetro digital (Bronther®). Além disso, durante todos os dias de estudo, os animais foram pesados para a análise da variação do peso corporal. A análise estatística foi realizada através do teste ANOVA -1-way ou -2-way, seguido do pós-teste de Bonferroni sendo considerado nível de significância de 5%. Os resultados obtidos indicam que a aminoguanidina reverte a nocicepção e a redução do gânglio trigeminal. Nenhum animal dos grupos teste e Sham apresentaram escores maiores do que zero, ademais os animais tratados com AG apresentaram maior limiar de nocicepção massetéica em comparação ao grupo controle negativo, que demonstrou redução significativa do limiar entre os dias 3, 4 e 5 ($p < 0.001$). Esses resultados se repetem em relação à variação da massa corpórea, pois, o grupo tratado com AG apresentou o mesmo comportamento do sham, sem perda de peso significativa ao longo do experimento. Quanto à avaliação dos corpos neuronais, o grupo salina apresentou redução significativa da área média dos corpos neuronais em comparação ao grupo Sham e ao grupo tratado com AG ($p = 0.019$). Diante disso, conclui-se que a enzima iNOS exerce importante papel na nocicepção e desconforto orofacial em ratas submetidas a clareamento dentário com peróxido de hidrogênio a 35% e AG apresenta efeito protetor em gânglios trigeminiais.

Palavras-chave: Nocicepção. Clareamento dental. Aminoguanidina. Óxido nítrico.

ABSTRACT

Hydrogen peroxide has deleterious effects on dental tissues, causing pain and sensitivity in many patients undergoing bleaching, due to oxidative stress and inflammation induced by this compound. Nitric oxide (NO) is one of the most important reactive oxygen species for inducing toxicity mediated by phagocytic cells, which synthesize NO through induced nitric oxide synthase (iNOS). Therefore, this study aimed to evaluate the role of iNOS in nociception and orofacial discomfort in female rats submitted to tooth whitening with 35% hydrogen peroxide. For this purpose, 72 female Wistar rats were randomly divided into three experimental groups: a sham group submitted to the simulation of bleaching treatment and treated with saline, a control group submitted to bleaching treatment and treated with saline, and a test group submitted to to bleaching treatment and pharmacological blockade of iNOS with aminoguanidine (AG). Animals were weighed daily throughout the experimental protocol. After 24h, 48h and 7days, the animals were euthanized by anesthetic overdose and bilateral trigeminal ganglia were collected for processing and histological analysis. The animals euthanized after seven days were submitted to a daily behavioral study until the day of euthanasia (Grimace scales and the sum of the number of scratches and bites). After behavior analysis, the nociception test was performed using von Frey fiber filaments from a digital analgesimeter (Bronther®). In addition, during all study days, the animals were weighed to analyze the change in body weight. Statistical analysis was performed using the ANOVA -1-way or -2-way test, followed by the Bonferroni post-test with a significance level of 5%. The results obtained indicate that aminoguanidine reverses nociception and trigeminal ganglion reduction. None of the animals in the test and Sham groups had scores greater than zero, and the animals treated with GA had a higher masseteric nociception threshold compared to the negative control group, which showed a significant reduction in the threshold between days 3, 4 and 5 ($p < 0.001$). These results are repeated in relation to the variation of body mass, as the group treated with AG presented the same behavior as the sham, without significant weight loss throughout the experiment. As for the evaluation of neuronal bodies, the saline group showed a significant reduction in the mean area of the neuronal bodies compared to the Sham group and the group treated with AG ($p=0.019$). Therefore, it is concluded that the iNOS enzyme plays an important role in nociception and orofacial discomfort in rats submitted to tooth whitening with 35% hydrogen peroxide and AG has a protective effect on trigeminal ganglia.

Keywords: Nociception. Tooth whitening. Aminoguanidine. Nitric oxide.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	7
1.1. Estética dental e bem estar social	7
1.2. Tratamento clareador	7
1.3. Estresse oxidativo sobre o tecido pulpar	8
1.4. Bloqueio seletivo de iNOS pelo fármaco aminoguanidina	9
2. HIPÓTESES	11
3. OBJETIVOS	12
3.1. Objetivo Geral	12
3.2. Objetivos Específicos	12
4. METODOLOGIA	13
4.1. Manutenção dos animais	13
4.2. Cálculo amostral	13
4.3. Grupos de estudo e protocolo experimental	13
4.4. Estudo de comportamento e variação de massa corpórea	14
4.5. Ensaio de nocicepção	16
4.6. Processamento histológico e análise histológica dos glânglios trigeminais	16
4.7. Análise estatística	17
5. RESULTADOS	18
5.1. <i>Tratamento com aminoguanidina, um inibidor seletivo da iNOS, reverte a nocicepção de ratas submetidas a clareamento dental com peróxido de hidrogênio 35%.</i>	18
5.2. <i>Tratamento com aminoguanidina, um inibidor seletivo da iNOS, reverte as alterações comportamentais de ratas submetidas a clareamento dental com peróxido de hidrogênio 35%.</i>	19
5.3. <i>Tratamento com aminoguanidina, um inibidor seletivo da iNOS, reverte a perda de peso de ratas submetidas a clareamento dental com peróxido de hidrogênio 35%.</i>	20
5.4. <i>Tratamento com aminoguanidina, um inibidor seletivo da iNOS, reverte as alterações histomorfométricas do gânglio trigeminal em ratas submetidas a clareamento dental com peróxido de hidrogênio 35%.</i>	21
6. DISCUSSÃO	24
7. CONCLUSÃO	28
REFERÊNCIAS	29
ANEXO A - APROVAÇÃO NO COMITÊ DE ÉTICA	35

1. INTRODUÇÃO

1.1. Estética Dental e Bem Estar Social

Nos últimos anos, notou-se que a procura por clareamento dental no consultório odontológico cresceu significativamente, demonstrando que o sorriso apresenta grande influência sobre a harmonia e estética da face. Desse modo, nota-se a contribuição da odontologia para a melhoria da auto estima e bem estar de muitos pacientes que buscam, através da estética do sorriso, sentirem-se mais belos e admirados em seu meio social. (OLIVEIRA et al., 2014).

Dentes mais brancos estão associados, para a maioria da população, a melhor saúde bucal (OLIVEIRA et al., 2014). Além disso, dentre as características dentárias: forma, alinhamento e cor, esta última é a que mais chama atenção dos pacientes odontológicos, por ser rapidamente percebida (TIN-OO et al., 2011; DEMARCO et al., 2009).

1.2. Tratamento Clareador

Dentre as técnicas para clarear dentes, as mais utilizadas na rotina clínica são o clareamento de consultório e a autoaplicação supervisionada, também chamado de clareamento caseiro (ROBERTO et al., 2011).

No tratamento realizado em consultório é comum o uso de gel clareador à base de peróxido de hidrogênio ou de substâncias que se dissociam nele, como o peróxido de carbamida (FEINMAN, et al., 1991), em concentrações que variam de 25% a 50% para a primeira substância e em torno de 35% para a última (ROBERTO et al., 2011).

As principais vantagens da técnica de clareamento de consultório estão relacionadas à administração do produto, uma vez que, o próprio dentista emprega o tratamento e detém maior controle da aplicação da substância no paciente, livrando regiões de retração gengival, locais estes propícios a reações de hipersensibilidade. Além disso, esse método não exige colaboração do paciente e apresenta efeito clareador mais rápido quando comparado a técnica de clareamento caseiro (SOARES et al., 2008; PERDIGÃO et al., 2004).

A técnica de clareamento caseiro consiste na autoaplicação pelo paciente de uma solução a base de peróxido de carbamida (10-22%) ou peróxido de hidrogênio (4%-8%)

associado a moldeiras personalizadas de acetato. Este tratamento exige colaboração do paciente e apresenta menor índice de recidiva de cor à longo prazo, porém alguns pacientes não se adaptam ao uso das moldeiras por vários minutos, durante muitos dias (MARSON et al., 2006; ROBERTO et al., 2011).

O mecanismo de ação do peróxido de hidrogênio baseia-se na quebra de moléculas cromóforas complexas do esmalte e da dentina, induzida por espécies reativas de oxigênio (EROs), resultantes da dissociação do peróxido de hidrogênio. Uma vez que, essas moléculas tornam-se menores, refletem mais a luminosidade do ambiente e conferem aparência dental mais clara (KIHN, 2007).

1.3. Estresse Oxidativo sobre o Tecido Pulpar

As EROs estão associadas a indução da inflamação no organismo como resposta imunológica, por meio de sinalização celular e de toxicidade aos agentes patógenos. Contudo, o estresse oxidativo exacerbado, pode induzir aos tecidos dentais a redução da capacidade de regeneração pulpar, levando a necrose e dor, além de reduzir a proliferação e o metabolismo celular (CINTRA et al., 2013; SOARES et al., 2015; SOUZA et al., 2010).

O óxido nítrico (NO) é uma das mais importantes espécies reativas de oxigênio com funções importantes para homeostasia do organismo. Essa molécula é produzida por várias células do corpo, por meio de hemoproteínas chamadas de NO sintase (NOS) (SCHNACKENBERG, 1997).

Existem 3 tipos de NOS. A isoforma tipo 1 ou cNOS, apresenta caráter constitutivo das células neuronais, epiteliais, adrenais, renais, músculo esquelético e outros. Enquanto a isoforma tipo 3 ou eNOS, embora seja constitutiva, restringe sua função a produzir NO em endotélio vascular sob condições basais (FÖRSTERMANN et al., 1994). Por fim, a isoforma tipo 2 ou iNOS é induzida a expressar-se nas paredes de células fagocitárias mediante a presença de citocinas inflamatórias. O problema é que a concentração aumentada de NO no meio inflamatório confere toxicidade não apenas para patógenos ou células tumorais, mas também pode lesar células saudáveis próximas, causando mais inflamação na região, induzindo dor e até perda de função em casos crônicos (STUEHR et al., 1991; FILHO; ZILBERSTEIN, 2000).

1.4. Bloqueio Seletivo de iNOS pelo Fármaco Aminoguanidina

A aminoguanidina (AG) é um fármaco experimental com capacidade de reduzir o estresse oxidativo, através da inibição seletiva da enzima óxido nítrico sintase induzível. Desse modo, a AG promoveria uma modulação da resposta inflamatória, bem como da dor associada ao clareamento dental, revelando-se um interessante mecanismo de redução da toxicidade e seus efeitos deletérios, consequentes do uso prolongado de peróxido de hidrogênio em superfícies dentárias (ZHANG et al., 2002).

A aminoguanidina é um potente inibidor de iNOS, sendo considerado um potencial fármaco anti-inflamatório, anti-nociceptivo e anti-oxidante, e no presente estudo, as diferentes análises realizadas demonstrou que os grupos tratados com esta substância e submetidos ao clareamento dental, apresentou uma reversão da nocicepção, melhores parâmetros comportamentais e manutenção da área dos corpos neuronais. A iNOS tem importantes funções associadas a produção de óxido nítrico, no entanto esse radical livre pode se comportar de maneira protetiva ou pró-inflamatória e degenerativa, mediante sua concentração celular (SUSCHEK et al., 2004).

Em um estudo desenvolvido por Hosseini et al. (2020), os autores relatam a redução de IL-1 α e IL-1 β , TNF- α e Interleucina-6 (IL-6), assim como a redução do metabólito NO, após injeção de aminoguanidina. O estudo simulou a disfunção renal induzida por lipopolissacarídeos bacteriano (LPS) em ratos, e concluiu que o efeito de melhora clínica – avaliado pela redução dos níveis séricos dos marcadores renais BUN e creatinina – promovida pela AG pode ser devido aos seus efeitos atenuantes nas respostas inflamatórias e no estresse oxidativo causados pelo LPS.

A supressão de IL-1 β , bem como de TNF- α foi encontrada no estudo desenvolvido por Freitas et al. (2016), que visava avaliar a hipernocicepção em modelos experimentais de inflamação da articulação temporomandibular induzida por zimosan. Os ratos foram tratados com AG e lectina de *Abelmoschus esculentus* em associação e observou-se significativa redução da hipernocicepção. Embora, a aminoguanidina não tenha sido administrada isoladamente neste estudo, a redução significativa da expressão de IL-1 e TNF aponta o potencial antiinflamatório da AG.

Diante disso, o presente estudo se revela uma importante ferramenta para esclarecer o efeito da inibição de iNOS e ON, a partir do bloqueio com aminoguanidina sobre a dor e o desconforto orofacial associados ao tratamento de clareamento dentário. Tendo em vista a escassez de estudos na literatura sobre os efeitos da AG em tecidos orais, este

estudo poderá esclarecer como a ação trigeminal deste fármaco, bem como sua eficácia protetora quanto a hipernocicepção decorrente de trauma pulpar por clareamento.

2. HIPÓTESES

H0- O bloqueio da iNOS via aminoguanidina não exerce papel importante na nocicepção e desconforto orofacial em ratas submetidas a clareamento dentário.

H1- O bloqueio da iNOS via aminoguanidina exerce importante papel na nocicepção e desconforto orofacial em ratas submetidas a clareamento dentário.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Avaliar o papel da enzima óxido nítrico sintase induzida na nocicepção e desconforto orofacial em ratas submetidas a clareamento dental com peróxido de hidrogênio.

3.2. Objetivos Específicos

- Avaliar as alterações nociceptivas em ratas submetidas ao clareamento dentário com peróxido de hidrogênio com e sem bloqueio com aminoguanidina;
- Avaliar as alterações do comportamento em ratas submetidas ao clareamento dentário com peróxido de hidrogênio com e sem bloqueio com aminoguanidina;
- Avaliar histologicamente a influência do clareamento dental com peróxido de hidrogênio no gânglio trigeminal de ratas da linhagem Wistar;
- Avaliar a influência do bloqueio da iNOS nas características histomorfométricas do gânglio trigeminal de ratas submetidas ao clareamento dentário com peróxido de hidrogênio.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Manutenção dos animais

O presente trabalho foi aprovado na comissão ética de uso de animais do Centro Universitário Christus (Unichristus) com número de protocolo 38/19 (Anexo I), sendo utilizado 72 ratas fêmeas, pesando entre 180 e 220 gramas, da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*), obtidos do Biotério Central do referido centro para este estudo. Durante a realização dos experimentos, todos os esforços possíveis foram utilizados para minimizar o sofrimento dos animais. As ratas foram abrigadas a 23° C em ciclo luz-escuro de 12 horas com acesso a água e alimento *ad libitum* e mantidas em gaiolas de polipropileno em número de 04 animais por gaiola.

4.2. Cálculo amostral

Baseado no estudo de Louzada et al. (2018), o qual observou que, dois dias após clareamento dentário, a polpa dentária de 85% das ratas tratadas com peróxido de hidrogênio apresentara intenso infiltrado inflamatório na porção oclusal versus 0% dos animais controle, estimou-se necessário avaliar oito ratas por grupo, a cada dia, a fim de se obter uma amostra que represente com 90% de poder e 95% de confiança a hipótese alternativa deste estudo.

4.3. Grupos de estudo e protocolo experimental

Os animais (180-200g) foram mantidos com água e ração *ad libitum*, em ciclo claro-escuro de 12h, temperatura de 20-25°C e pesados diariamente. Os animais foram aleatoriamente (comando “Aleatório”, Microsoft Excel, 2010, Microsoft Corporation®) divididos em quatro grupos: um grupo sham, submetido à simulação do tratamento clareador e tratado diariamente com solução salina 0,1ml/kg subcutânea; um grupo controle submetido ao clareamento dental e tratado diariamente com solução salina 0,1ml/kg subcutânea; e um grupo teste, submetido a tratamento clareador e bloqueio farmacológico da iNOS com aminoguanidina 50mg/kg por via subcutânea diariamente.

Cada grupo contou com três momentos de eutanásia, após 24h, 48h e 7 dias do clareamento e como foram utilizadas oito ratas por grupo por dia de eutanásia, o total de animais foi de 72 ratas para este experimento.

Imediatamente antes da aplicação do gel clareador, os grupos controle (salina e sham) e teste receberam 0,1 ml/kg de solução salina e os animais do grupo teste receberam 50mg/kg em solução equívolumétrica de aminoguanidina diariamente até o dia de eutanásia (LIMA Jr. et al., 2012).

Foi utilizado o protocolo de clareamento dentário proposto por Silva-Costa, et al. (2018) que consiste em, inicialmente, anestésiar os animais com xilazina (20 mg/kg) e quetamina (80 mg/kg). Após anestesia, os animais foram mantidos de boca aberta, utilizando um dispositivo intermaxilar ajustado como abridor de boca e uma barreira gengival foi aplicada nos molares superiores bilaterais dos animais (FGM Dentscare LTDA, Joinville, SC, Brazil) para aplicação do gel clareador de H₂O₂ 35% Whiteness HP Blue (FGM) nos dentes isolados (0,02 ml por dente) por 15 minutos. Os animais do grupo sham também foram anestesiados, mantidos de boca aberta pelo mesmo tempo, utilizando os mesmos dispositivos, mas não foram submetidos ao gel clareador.

Após 24h, 48h e 7 dias, os animais foram eutanasiados por sobredose anestésica de xilazina (50 mg/kg) e quetamina (150 mg/kg). Foram coletados os gânglios trigeminiais bilateralmente para fixação em formol neutro 10% e realizado o processamento histológico. O estudo comportamental foi realizado, previamente, nos animais que foram eutanasiados após sete dias de experimento.

4.4. Estudo de comportamento e variação de massa corpórea

Imediatamente antes de iniciar o protocolo experimental, os animais foram individualmente acondicionados em sala escura com luz vermelha em uma caixa de polipropileno para armazenamento de camundongos. Após cinco minutos de acondicionamento, foram cronometrados por mais cinco minutos o número de mordidas e o número de coçadas sobre as vibrissas. Esse protocolo foi iniciado três dias antes do clareamento dental e repetido diariamente até a eutanásia dos animais no sétimo dia experimental.

Nos mesmos períodos, os animais foram pesados para avaliação da variação de massa corpórea e foi aplicada a escala de Grimace para avaliação de dor e sofrimento. A escala de Grimace estabelece níveis de dor e desconforto em animais de experimentação

dando escores que variam de 0 (nenhuma dor/sofrimento) a 1 (dor/sofrimento leve) e 2 (dor/sofrimento acentuado) para os seguintes parâmetros:

- Posição dos olhos: classifica como 0 olhos bem abertos, 1 olhos meio fechados e, 2 olhos bastante fechados e lacrimejantes;

- Posição do nariz: classifica como 0 nariz ereto, 1 nariz discretamente arqueado para superfície plana e, 2 nariz bastante arqueado para a superfície plana;

- Posição das bochechas: classifica como 0 bochechas retilíneas sem interferir na órbita, 1 bochechas discretamente edemaciadas influenciando moderadamente na órbita e, 2 bochechas edemaciadas interferindo diretamente na órbita e no fechamento ocular;

- Posição das orelhas: classifica como 0 orelhas eretas, 1 orelhas discretamente arqueadas e, 2 orelhas totalmente arqueadas e em direção caudal;

- Posição das vibrissas: classifica como 0 vibrissas homogêneas, 1 vibrissas discretamente espaçadas e, 2 vibrissas bem espaçadas com aumento do edema da bochecha.

Figura 1: Modelo de análise das escalas de Grimace para avaliação dos níveis de dor/sofrimento em animais em experimentação segundo o critério de posição do olho.



Fonte: Portal Nacional Centre for the Replacement Refinement & Reduction of Animals in Research.

Disponível em: <<https://www.nc3rs.org.uk/grimacescales> >. Acesso em: 16 de setembro de 2018.

Após avaliação, os escores foram somados para obtenção de média e construção da unidade amostral.

4.5. Ensaio de nocicepção

Após análise de comportamento, foi realizado o ensaio de nocicepção, usando filamentos de fibra de Von Frey de um analgesímetro digital (Bronther®). O analgesímetro digital utilizado apresenta capacidade do transdutor: 0,1 até 1000 gramas (aprox. 1 mN até 10 N), resolução de 2 mV/V, tTempo de reação entre 1mseg - 150 mseg, faixa de temperatura: 10-60°C.

Um único operador, previamente calibrado, apoiou o animal na palma da mão até que o animal estivesse acomodado e condicionado e, em seguida, pressionou-se com o filamento de Von Frey a região massetéica do animal. Esse processo foi repetido durante três vezes em cada lado do animal (primeiro lado direito, depois lado esquerdo). O teste mediu, em Newton, a força que o animal suporta até desenvolver mecanismo de escape. Este teste foi realizado três dias antes do protocolo experimental para condicionamento do animal, sendo realizado diariamente, até o dia da eutanásia. A média das triplicatas dos lados direito e esquerdo foi usado como unidade amostral (SILVA et al., 2020).

Uma das principais causas da dor miofascial é a de origem pulpar e estudos têm mostrado efeito potencialmente tóxico dos clareamentos dentais na polpa dentária (SILVA et al., 2019). O tecido pulpar apresenta na região sub-odontoblástica um denso complexo de fibras nervosas conhecido como plexo de Rashcow, o qual é responsável pela resposta à dor (em humanos) e nocicepção (em animais), e que é sensibilizado a partir das citocinas e mediadores químicos produzidos durante o processo inflamatório (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2013), configurando-se um alvo de investigação de novas terapias que podem reduzir a inflamação causada pelo tratamento clareador. O processo inflamatório libera neuropeptídeos relacionados com a transmissão da informação nociceptiva conduzindo impulsos para o sistema nervoso central (CHIDIAC et al., 2002).

4.6. Processamento histológico e análise histológica dos glânglios trigeminiais

Após fixação em formol tamponado 10% (Na₂HPO₄ dibásico anidro = 6,5g; Na₂HPO₄ monobásico = 4g; Formol para análise = 100mL; Água destilada = quantidade suficiente para 1L) por 48h, as amostras seguiram para processamento histológico. Os fragmentos foram analisados macroscopicamente e submetidos à desidratação em série alcoólica crescente, diafanização em xilol, impregnação em parafina fundida a 60°C e

inclusão dos fragmentos na mesma, formando blocos à temperatura ambiente para confecção de lâminas histológicas (Hematoxilina-eosina, 3 μ m).

Os cortes foram realizados em micrótomo semi-automático (Leica®). Realizou-se cinco fotomicrografias no aumento de 400x do gânglio (lados direito e esquerdo) em áreas com maior quantidade de corpos neuronais. Após isso, as imagens foram exportadas para o software Image® e a média de área por corpo neuronal foi utilizada como unidade amostral.

4.7. Análise Estatística

Os dados foram transcritos em uma planilha base no Microsoft Excel e exportados para o software GraphPad Prism 5,0 adotando uma confiança de 95%. As medidas quantitativas foram expressas em forma de média e erro-padrão da média e analisados por meio do teste ANOVA -1-way ou -2-way, seguido do pós-teste de Bonferroni.

5. RESULTADOS

5.1. Tratamento com aminoguanidina, um inibidor seletivo da iNOS, reverte a nocicepção de ratas submetidas a clareamento dental com peróxido de hidrogênio 35%.

Após o clareamento os grupos Sham, salina e aminoguanidina apresentaram redução do limiar nociceptivo em região massetéica ao longo do estudo ($p < 0.001$). No entanto, não houve diferença significativa entre o grupo aminoguanidina e o grupo Sham ($p = 0.827$), ao passo que o grupo salina mostrou menor limiar nociceptivo do terceiro ao sétimo dia em comparação com o grupo Sham ($p < 0.001$) (Figura 2).

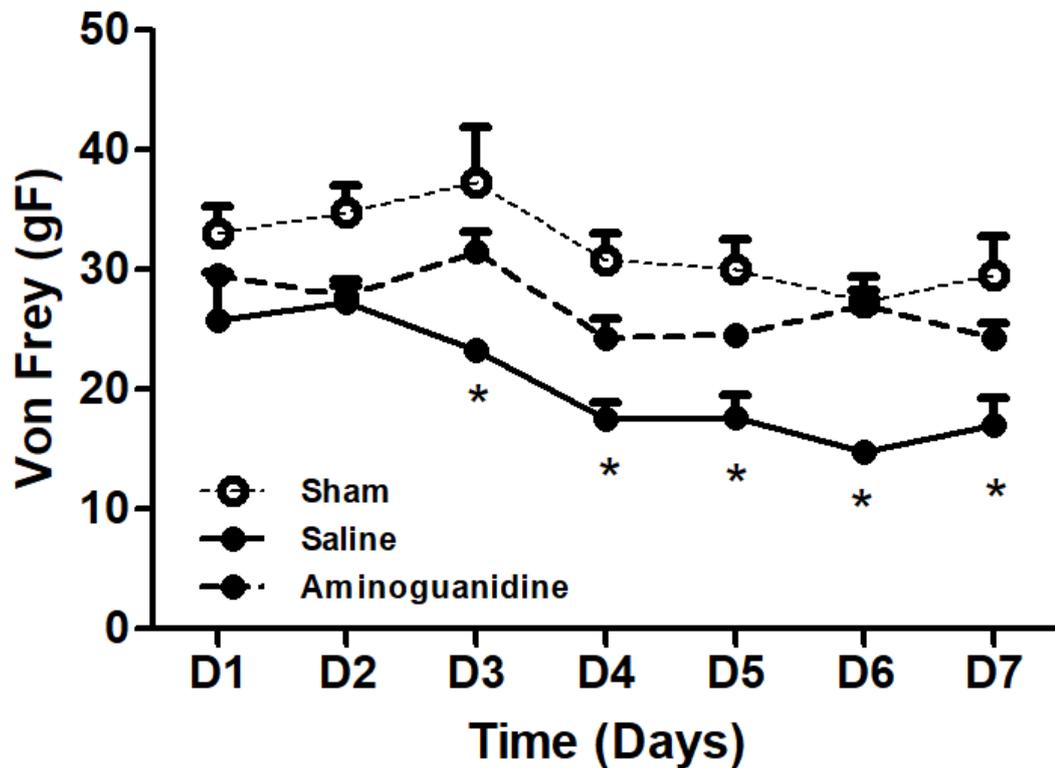


Figura 2: Influência do tratamento com aminoguanidina no limiar nociceptivo em ratas submetidas a modelo experimental de clareamento dental com peróxido de hidrogênio.

* $p < 0,05$ versus grupo Sham, ANOVA-2-way para medidas repetidas/Bonferroni (média \pm EPM).

5.2. Tratamento com aminoguanidina, um inibidor seletivo da iNOS, reverte as alterações comportamentais de ratas submetidas a clareamento dental com peróxido de hidrogênio 35%.

Nenhum animal dos grupos Sham ou do grupo tratado com aminoguanidina apresentou escores superiores a 0 na escala de Grimace. No entanto, o somatório das escalas de Grimace no grupo salina foi significativamente superior a ambos os grupos nos dias quatro, cinco e seis, após o clareamento dental ($p < 0.001$) (Figura 3).

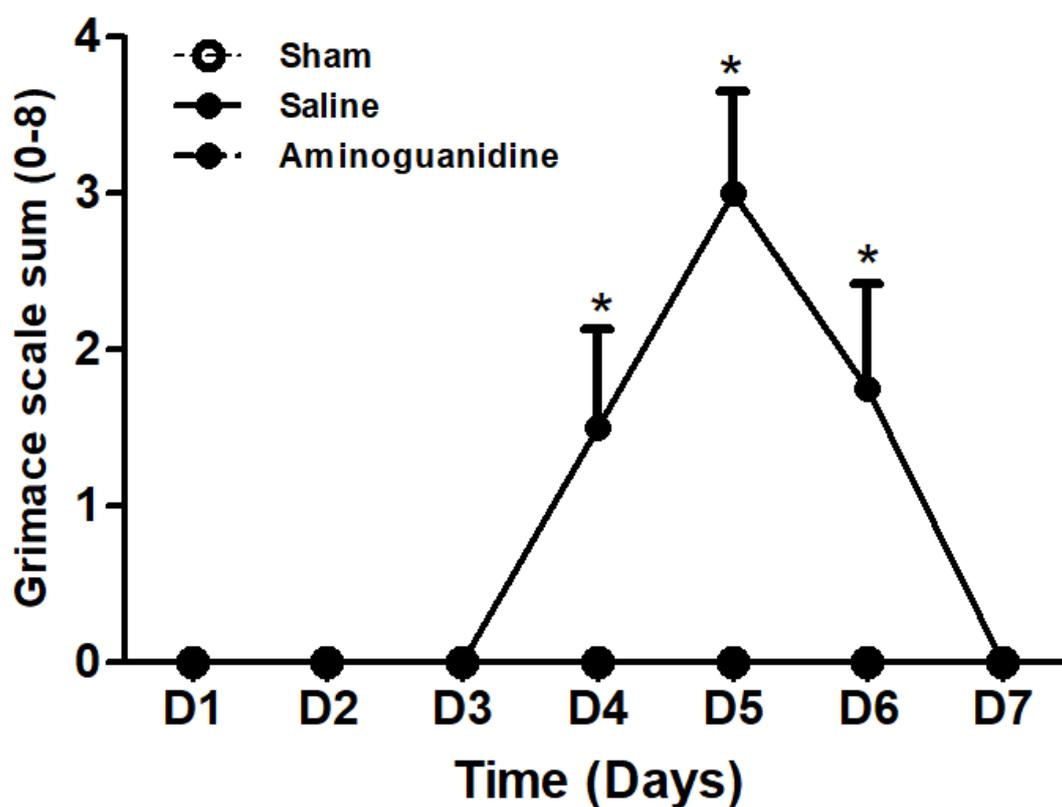


Figura 3: Influência do tratamento com aminoguanidina nos sinais de sofrimento das escalas de Grimace em ratas submetidas a modelo experimental de clareamento dental com peróxido de hidrogênio.

* $p < 0,05$ versus grupo Sham, ANOVA-2-way para medidas repetidas/Bonferroni (média \pm EPM).

O número de mordidas não mostrou variação significativa nos grupos Sham e aminoguanidina. A média de mordidas/5 minutos não diferiu significativamente entre esses dois grupos ($p=0.457$), no entanto, o grupo salina apresentou valores significativamente mais altos do terceiro até o sétimo dia, após o clareamento ($p=0.011$). O número de coçadas apresentou uma elevação significativa tanto no grupo salina como no grupo aminoguanidina, no quinto dia após o clareamento, retornando aos valores basais, a partir do dia seis. Essa diferença em comparação com o grupo Sham foi estatisticamente significativa ($p=0.001$) (Figura 4).

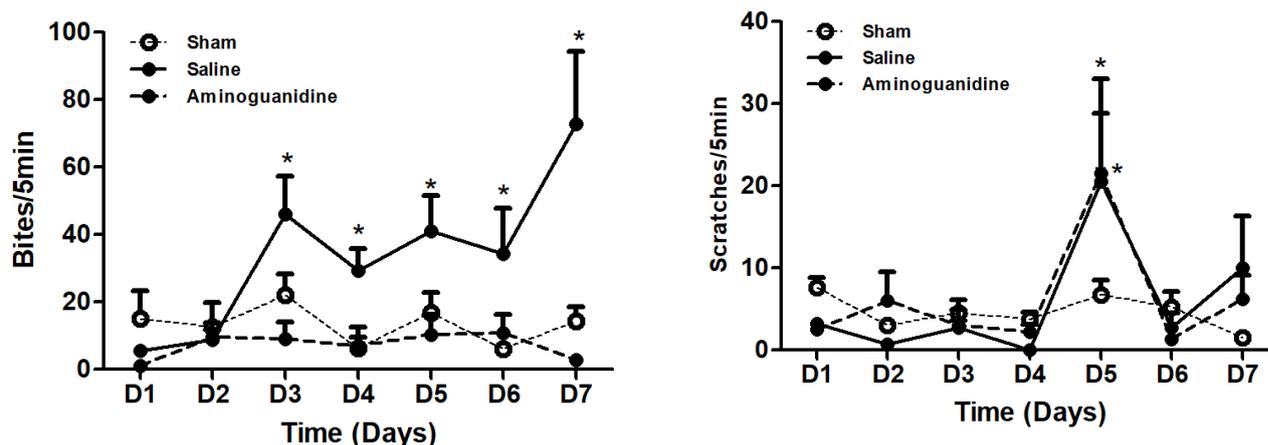


Figura 4: Influência do tratamento com aminoguanidina no número média de mordidas e coçadas em ratas submetidas a modelo experimental de clareamento dental com peróxido de hidrogênio.

* $p < 0,05$ versus grupo Sham, ANOVA-2-way para medidas repetidas/Bonferroni (média \pm EPM).

5.3. Tratamento com aminoguanidina, um inibidor seletivo da iNOS, reverte a perda de peso de ratas submetidas a clareamento dental com peróxido de hidrogênio 35%.

Por sua vez, a variação de massa corpórea mostrou que o grupo tratado com aminoguanidina apresentou o mesmo comportamento que o grupo Sham, sem perda de peso significativa ao longo do protocolo experimental. Os dois grupos não diferiram entre

si ($p=0.966$), mas o grupo salina apresentou maior perda de peso que esses dois grupos nos dias três a seis, após o clareamento dental ($p=0.007$) (Figura 5).

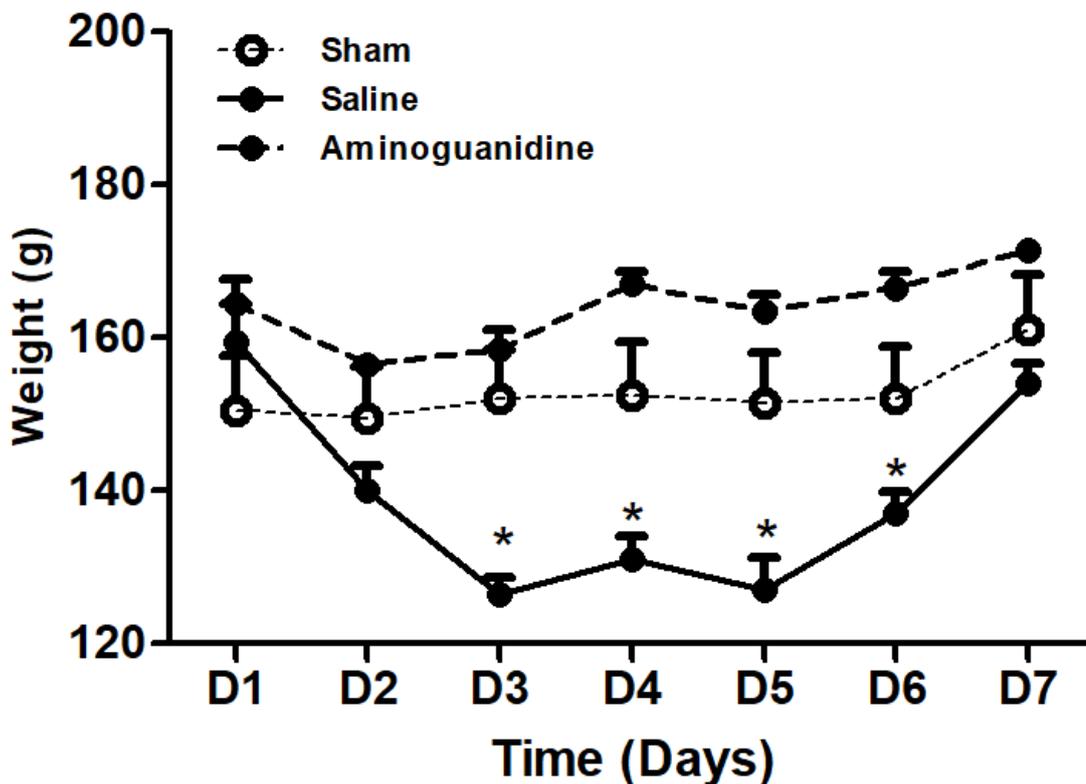


Figura 5: Influência do tratamento com aminoguanidina na perda de massa corpórea em ratas submetidas a modelo experimental de clareamento dental com peróxido de hidrogênio.

* $p < 0,05$ versus grupo Sham, ANOVA-2-way para medidas repetidas/Bonferroni (média \pm EPM).

5.4. Tratamento com aminoguanidina, um inibidor seletivo da iNOS, reverte as alterações histomorfométricas do gânglio trigeminal em ratas submetidas a clareamento dental com peróxido de hidrogênio 35%.

Após 24h do clareamento dental, o grupo tratado com solução salina ($603.70 \pm 13.65 \mu\text{m}^2$) apresentou redução significativa da área média dos corpos neuronais em comparação ao grupo Sham ($691.40 \pm 24.65 \mu\text{m}^2$) e o tratamento com aminoguanidina ($678.60 \pm 12.77 \mu\text{m}^2$) reverteu significativamente essa redução ($p=0.006$) (Figura 6).

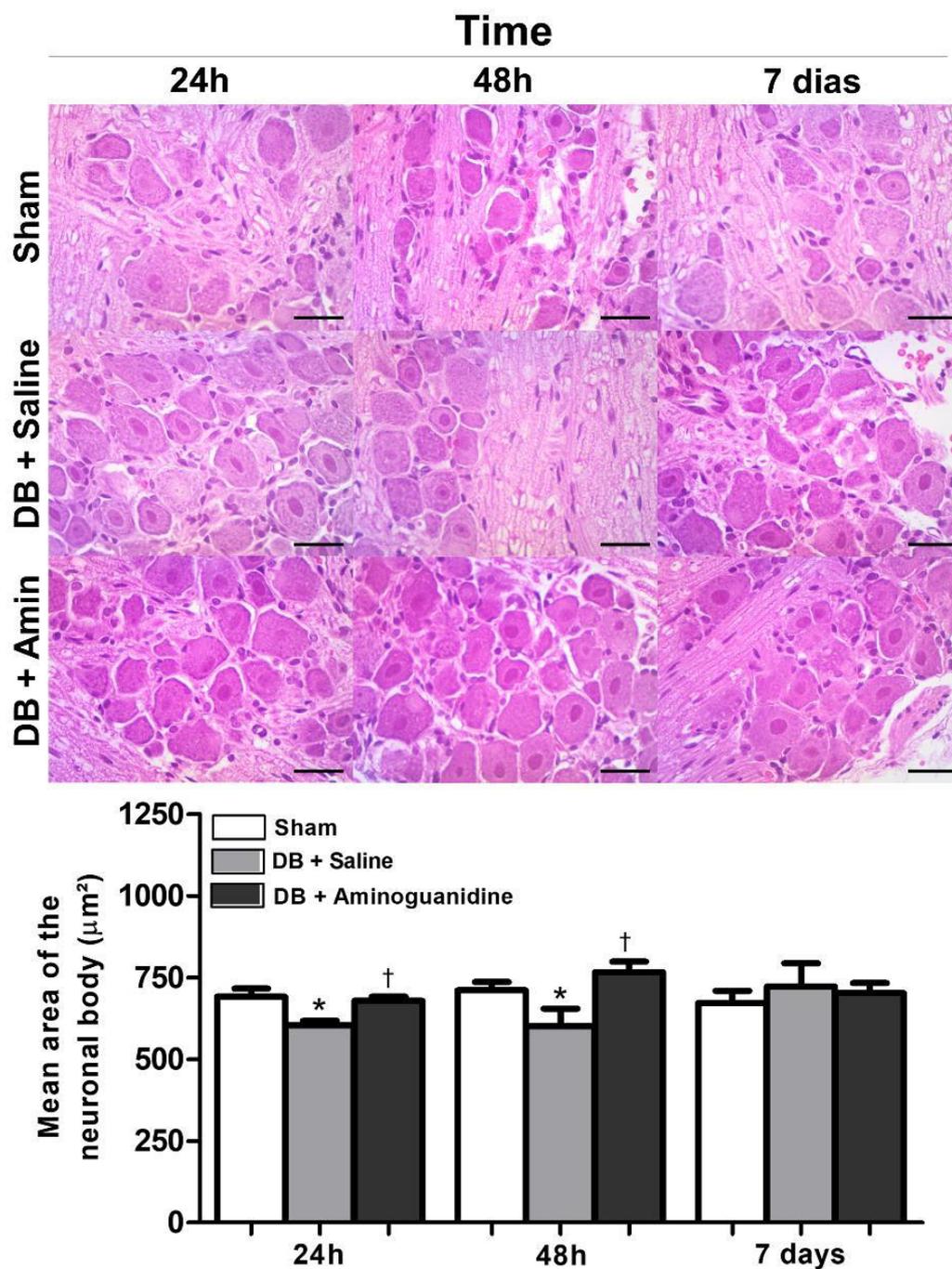


Figura 6: Influência do tratamento com aminoguanidina na área média dos corpos neuronais do gânglio trigeminal de ratas submetidas a modelo experimental de clareamento dental com peróxido de hidrogênio.

* $p < 0,05$ versus grupo Sham, † $p < 0,05$ versus grupo salina; ANOVA/Bonferroni (média \pm EPM). DB = dental bleaching. Barra = 50 μm . Aumento = 400x.

Após 48h do clareamento dental, os resultados foram semelhantes. O grupo tratado com solução salina ($600.20 \pm 54.68 \mu\text{m}^2$) apresentou redução significativa da área média dos corpos neuronais em comparação ao grupo Sham ($711.40 \pm 24.21 \mu\text{m}^2$) e o tratamento com aminoguanidina ($765.80 \pm 32.63 \mu\text{m}^2$) reverteu significativamente essa redução ($p=0.019$) (Figura 6).

Após sete dias do clareamento dental, não houve diferença significativa entre a média da área dos corpos neuronais entre os três grupos ($p = 0.800$) (Figura 6).

6. DISCUSSÃO

Diante dos resultados deste estudo, verifica-se que a aminoguanidina é capaz de reverter a nocicepção e o efeito negativo no peso dos animais, por meio do bloqueio seletivo de iNOS e a consequente regulação do radical livre ON, promovendo a modulação da resposta inflamatória, em ratas submetidas a tratamento com peróxido de oxigênio a 35%.

A aminoguanidina é um potente inibidor de iNOS, sendo considerado um potencial fármaco anti-inflamatório, anti-nociceptivo e anti-oxidante, e no presente estudo, as diferentes análises realizadas demonstrou que os grupos tratados com esta substância e submetidos ao clareamento dental, apresentou uma reversão da nocicepção, melhores parâmetros comportamentais e manutenção da área dos corpos neuronais.

A escala de Grimace em ratos é utilizada como um teste confiável para avaliação da nocicepção de curto e longo prazo (dor aguda e crônica) em roedores (LANGFORD et al., 2010; AKINTOLA, et al., 2017). No presente estudo, nenhum animal dos grupos Sham e Aminoguanidina apresentaram escores maior que 0, segundo a escala utilizada. No entanto, para o grupo Sham, durante os dias três, quatro e cinco, notou-se uma pontuação significativa de escores da escala Grimace, sendo no quinto dia o pico de dor observado.

Até onde sabemos, apenas um outro estudo avaliou nocicepção após lesão pulpar em ratos, através da escala Grimace. O estudo de Rossi et al., (2020) avaliou além da expressão facial, o tempo de escape ao estímulo doloroso, indicando que uma lesão mesmo sendo unilateral demonstra ter envolvimento e ativação do sistema nervoso central, uma vez que foi verificada resposta dolorosa bilateral. Isto indica a complexa relação de sinalização neuronal no sistema estomatognático existente nos animais. Desse modo, a inflamação pulpar mesmo sendo localizada pode repercutir nos músculos gnáticos, como verificado neste estudo, por meio do teste de nocicepção massetéica.

O teste de nocicepção de Von Frey mostrou que o grupo aminoguanidina apresentou menor redução no limiar de nocicepção quando comparado ao grupo salina ao longo dos sete dias de acompanhamento, sugerindo que o bloqueio da enzima óxido nítrico sintase induzida é capaz de modular a resposta inflamatória e atenuar seus efeitos colaterais, sobretudo a dor associada ao tratamento com peróxido de hidrogênio.

A hiperalgesia, muitas vezes, verificada durante os tratamentos clareadores, pode ser decorrente da inflamação, promovida pela oxirredução do peróxido de hidrogênio,

induzindo grande concentração de citocinas e espécies reativas de oxigênio, dentre elas o ON (SOARES et al., 2015). Por sua vez, o ON apresenta a capacidade de ativar a expressão de Interleucina-1 β (IL-1 β), produzindo excesso de Prostaglandina-E2 (PGE2), levando a sensibilização dos receptores neuronais (SHIRAZI et al., 2001), presentes no gânglio trigeminal (OLIVEIRA et al., 2011). Uma vez que as terminações nervosas dos nervos pulparem residem no gânglio trigeminal (KADALA et al., 2018), é plausível a associação de dor pulpar, via gânglio trigeminal, e a nocicepção no músculo masseter, que é inervado pelo nervo massetérico, originário do ramo mandibular do nervo trigêmeo.

Além disso, a intolerância à estimulação mecânica massetéica pode ser exacerbada como consequência de um comportamento semelhante ao bruxismo, resultante de estresse emocional, observado em roedores, segundo relatado no estudo de Rosales et al. (2002). Sabendo-se que a dor é um importante promotor de estresse emocional, pode-se sugerir que os animais no grupo Sham apresentaram dor miofascial por também estarem sofrendo desta disfunção semelhante ao bruxismo.

A nocicepção massetéica parece ser uma complicação mais tardia associada ao estresse de uma dor aguda. No estudo Rossi et al. (2020) a nocicepção massetéica iniciou-se no quarto dia, tendo o sexto dia como pico; semelhante ao que foi observado neste estudo, no qual notou-se redução do limiar de nocicepção mais significativa a partir do terceiro dia, estendendo-se até o quinto dia, sendo constatado no quarto dia o pico desta redução. Acredita-se que a resposta dolorosa muscular pode ser mais tardia, pois está possivelmente condicionada a ativação nervosa central prévia, visto que o bruxismo está associado a ativação do córtex pré-frontal, que tem relevante importância na regulação da atividade do nervo trigêmeo (KAMIYA et al., 2010).

Em contrapartida o grupo tratado com AG apresentou reversão da nocicepção. A capacidade deste fármaco promover analgesia foi justificada no trabalho realizado por Ma et al. (2020). Os autores concluíram que a AG pode atenuar a hipernocicepção inflamatória, por meio da redução da expressão de Cicloxigenase-2 (COX-2) e, conseqüentemente de prostaglandinas, inclusive PGE2. É provável que o bloqueio da COX-2 ocorra em decorrência da inibição da translocação nuclear dos fatores de transcrição citoplasmático NF- κ B (p65), através da inibição da fosforilação de I κ B α e IKK β , reduzindo assim a sua expressão.

Em relação à perda de peso, verificou-se que os animais tratados com aminoguanidina comportaram-se de forma semelhante com o grupo Sham, com manutenção ou ganho de peso. Já no grupo salina houve perda de peso, provavelmente,

em consequência do desconforto e nocicepção causada pela substância clareadora que prejudica a ingestão de ração. Esses achados são corroborados pelos estudos de Cavalcante et al. (2011) em modelo de úlcera em mucosa jugal e Alves et al. (2004) em tumor experimental em mandíbula com Carcinossarcoma de Walker 256 em mandíbula de ratos, onde os autores também demonstraram perda de peso dos animais, referendando que injúrias na cavidade oral prejudicam a alimentação e, conseqüentemente, causam perda de peso.

Verifica-se uma estreita relação dos dados obtidos nesta pesquisa, entre o aumento da nocicepção, as alterações no comportamento e a perda de peso nos animais. É comprovado que o estresse tem efeito sobre o peso corporal, seja pelo aumento do cortisol ou pela variação de ingestão de alimento (MUTWEDU et al, 2020). Os animais tratados com aminoguanidina, provavelmente estariam livres de dor e submetidos a menor estresse, portanto teriam conseguido manter o seu peso mais facilmente.

Um outro achado importante da presente pesquisa foi a reversibilidade da manutenção da área dos corpos neuronais no grupo tratado com aminoguanidina, sugerindo uma provável ação deletéria do ON.

A iNOS tem importantes funções associadas a produção de óxido nítrico, no entanto esse radical livre pode se comportar de maneira protetiva ou pró-inflamatória e degenerativa, mediante sua concentração celular (SUSCHEK et al., 2004).

Segundo o estudo realizado por Wang et al. (2015) o principal efeito do excesso de ON ocorre sobre as mitocôndrias das células envolvidas na inflamação. Estes autores mostraram que o óxido nítrico induziu a sensibilização e abertura dos poros de transição de permeabilidade da mitocôndria (mPTP), aumentando a expressão de citocromo C, que está situado entre a membrana externa e a membrana interna da mitocôndria e, por consequência, promoveu dor por apoptose das células usadas como modelo experimental de osteoartrite.

O modelo cardíaco experimental desenvolvido por Behesht et al. (2020), aponta os efeitos cardioprotetores da aminoguanidina. A inflamação celular foi induzida por LPS e produziu aumento considerável de IL-6 e MDA. Dentre os resultados da administração de AG, destacou-se a reversão dos mediadores inflamatórios exacerbados e a supressão do peroxinitrito. Abraham e Rab (2011), ponderaram em seu estudo, que o metabólito peroxinitrito pode iniciar a peroxidação lipídica e potencializar a inflamação em células vasculares, desse modo, pode-se justificar a ação antioxidante da AG, devido sua capacidade de redução deste metabólito.

Portanto, na presente pesquisa, a supressão da iNOS pela AG demonstrou resultados neuroprotetores, com preservação da dimensão dos corpos celulares dos neurônios trigeminiais após indução do protocolo de clareamento dental.

Numerosos estudos *in vitro* têm mostrado o efeito deletério e tóxico das substâncias clareadoras dentais, porém, poucas pesquisas investigam as alterações microscópicas induzidas na polpa dentária. Apesar de nosso estudo ter sido realizado em ratas, configura-se uma limitação o fato de não termos a análise histológica do tecido pulpar, dados que permitiriam uma associação entre os achados de nocicepção, comportamento e perfil inflamatório. Além disso, há uma defasagem das análises de nocicepção identificadas nos modelos animais e da dor, que é definida como uma “experiência sensitiva e emocional desagradável associada ou relacionada a lesão real ou potencial dos tecidos”, tornando imprescindível a realização de ensaios clínicos randomizados em seres humanos.

Todavia o presente trabalho traz uma nova perspectiva da utilização da aminoguanidina em modelos inflamatórios abordando diversas condições bucais como também de nocicepção, visto que, há poucos trabalhos publicados com este fármaco avaliando a resposta em tecidos orais.

7. CONCLUSÃO

A enzima iNOS parece exercer importante papel na nocicepção e desconforto orofacial em ratas submetidas a clareamento dentário com peróxido de hidrogênio a 35% e o inibidor seletivo, aminoguanidina, apresenta efeito protetor em gânglios trigeminais.

REFERÊNCIAS

- ABRAHAM, P.; RABI, S. Protective effect of aminoguanidine against cyclophosphamide-induced oxidative stress and renal damage in rats. **Rev Redox Rep.** v. 16, n.1, p. 8–14, 2011.
- AKINTOLA, T.; RAVER, C.; STUDLACK, P.; UDDIN, O.; MARSI, R.; KELLERB, A. The grimace scale reliably assesses chronic pain in a rodent model of trigeminal neuropathic pain. **Neurobiol Pain.** v. 2, p.13–17, 2017.
- ALVES, A.P.N.N, GUEDES, R.C, COSTA-LOTUFO, L.V, MORAES, M.E.A, PESSOA, C.O, FERREIRA, F.V.A, MORAES, M.O. Modelo experimental de tumor na cavidade oral de ratos com carcinossarcoma de Walker 2561. **Acta Cir Bras** [serial online], v.19, n.4, jul-Ago, 2004.
- BEHESHTI, F.; HOSSEINI, F.; HASHEMZEH, M.; HADIPANAH, M.R.; · MAHMOUDABADY, M. The Cardioprotective Effects of Aminoguanidine on Lipopolysaccharide Induced Inflammation in Rats. **Cardiovascular Toxicology Online Rev.** 2020. Disponível em: < <https://doi.org/10.1007/s12012-020-09570-w> >. Acessado em: 28 de janeiro de 2021.
- CAVALCANTE, G.M.; DE PAULA, R.J.S.; DE SOUZA, L.P.; SOUSA, F.B.; MOTA, M.R.L.; ALVES, A. P. N. N. Experimental model of traumatic ulcer in the cheek mucosa of rats. **Acta Cirúrgica Brasileira.** v. 26, n. 3, 2011.
- CAVIEDES-BUCHELI J, ARIZA-GARCÍA G, RESTREPO-MÉNDEZ S, RÍOS-OSORIO N, LOMBANA N, MUÑOZ HR. The effect of tooth bleaching on substance P expression in human dental pulp. **J Endod.**, v.34, n.12, p.1462-5.2008. doi: 10.1016/j.joen.2008.09.013.
- CHIDIAC, J-J.; RIFAI, K.; HAWWA, N. N.; MASSAAD, C.A.; JURJUS, A. R.; JABBUR, S.J.J.; SAABÉ, N.E. Nociceptive behaviour induced by dental application of irritants to rat incisors: a new model for tooth inflammatory pain. **Eur J Pain.** v.6, n.1, p. 55-67, 2002.
- CINTRA, L.T.A.; BENETTI, F.; FACUNDO, A.C. S.; FERREIRA, L.L; GOMES-FILHOS, J.E.; ERVOLINO, E. The number bleaching sessions influences Pulp tissue damage in rat teeth. **Journal of Endodontics.** v. 39, n. 12, p. 1576-1580, 2013.
- DEMARCO, F.F; MEIRELES, S.S.; MASOTTI, A.S. Over-the-counter whitening agents: a concise review. **Braz Oral Res.** São Paulo, v. 23, n. 1, p. 64-70, 2009.
- FEINMAN, R.A.; MADRAI, G.; YARBOROUGH, D. Chemical, optical and physiologic mechanisms of bleaching products: a review. **Pract. Periodontics Aesthet. Dent.** New York, v.3, n.2, p.32-37, Mar. 1991.
- FILHO, R.F.; ZILBERSTEIN, B. Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. Metabolismo, síntese e funções. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, v.46, n.3, São Paulo, July/Sept., 2000.

FÖRSTERMANN U.; CLOSS E.I.; POLLOCK, J.S.; NAKANE, M.; SCHAWARZ, P.; GATH, I.; KLEINERT, H. Nitric oxide synthase isozymes: characterization, purification, molecular cloning, and functions. **Rev Hypertension**, v. 23, n. 2, p. 1121-31, 1994.

FRANCCI, C.; MARSON, F.C.; BRISO, A.L.F.; GOMES, M.N. Clareamento dental-técnicas e conceitos atuais. **Rev Assoc Paul Cir Dent** . v. 64, e. 1, p. 78-89, 2010.

FREITAS, R. S.; VAL, D.R.; FERNANDES, M.E.F.; GOMES, F.I.F.; LACERDA, J.T.J.G.; GADELHA, T.S.; GADELHA, C.A.A.; PINTO, V.P.T.P.; CRISTINO-FILHO, G.; PEREIRA, K.M.A.; BRITO, G.A.C.; BEZERRA, M.M.; CHAVES, H.V. Lectin from *Abelmoschus esculentus* reduces zymosan-induced temporomandibular joint inflammatory hypernociception in rats via heme oxygenase-1 pathway integrity and $\text{tnf-}\alpha$ and $\text{il-1}\beta$ suppression. **Rev International Immunopharmacology**. v. 38, p. 313-323, 2016.

HOSSEINI, M.; BEHESHTI, F.; ANAEIGOUDARI, A. Improving Effect of Aminoguanidine on Lipopolysaccharide-Caused Kidney Dysfunction in Rats. **Saudi Journal Kidney Dis Transpl**. v. 31, n.5, p.1025-1033, 2020.

KIHN, P.W. Vital tooth whitening. **Rev Dent. Clin. North Am.**, v. 51, n. 2, p. 319-331, Apr. 2007.

JUNQUEIRA LC & CARNEIRO J. **Histologia** básica, texto e atlas. Rio de Janeiro. 12^a edição, 2013.

KADALA, A. et al. Fluorescent Labeling and 2-Photon Imaging of Mouse Tooth Pulp Nociceptors. **Journal of Dental Research**. v.97, p. 460–466, 2018.

KAMIYA, K.; FUMOTO, M.; KIKUCHI, H.; SEKIYAMA, T.; MOHRI-LKUZAWA, Y.; UMINO, M.; ARITA, H. Prolonged gum chewing evokes activation of the ventral part of prefrontal cortex and suppression of nociceptive responses: involvement of the serotonergic system. **J Med Dent Sci**. v.57, n.1, p. 35-43, 2010.

LANGFORD, D.J.; BAILEY, A.L.; CHANDA, M.L.; CLARKE, S.E.; DRUMMOND, T.E.; ECHOLS, S.; GLICK, S.; INGRAO, J.; KLASSEN-ROSS, T.; LACROIX-FRALISH, M.L.; SORGE, R.E.; SOTOCINAL, S.G.; TABAKA, J.M.; WONG, D.; MAAGDENBERG, A.M.J.M. van den, FERRARRI, M.D.; CRAIG, K.D.; MOGIL, J.S. Coding of facial expressions of pain in the laboratory mouse. **Nature Methods**. v.7, p. 447–449, 2010.

LIMA JR. et al. Involvement of nitric oxide on the pathogenesis of irinotecan-induced intestinal mucositis: role of cytokines on inducible nitric oxide synthase activation. **Cancer and Chemotherapy Pharmacologic**, v. 69, n. 4, p. 931-942, 2012.

LOUZADA, L. M. et al. Anti-inflammatory potential of a carvedilol gel in the pulpal tissue of rats after dental bleaching: a histopatological evaluation. **Journal Investig Clin Dent**, v. 10, n. 2, 2018.

MA, Y.; SONG, X.; MA, T.; LI, Y.; BAI, H.; ZHANG, Z.; HU, H.; YUAN, R.; WEN, Y.; GAO, L. Aminoguanidine inhibits IL-1 β -induced protein expression of iNOS and COX-2 by blocking the NF- κ B signaling pathway in rat articular chondrocytes. **Rev experimental and therapeutic medicine**. v. 20, p. 2623-2630, 2020.

MARSON, F.C.; SENSI, L.G.; ARAÚJO, F.O.; ANDRADA, M.A.C.; ARAÚJO, E. Na era do clareamento dentário a laser ainda existe espaço para o clareamento caseiro? **R Dental Press Estet**. v. 3, n.1, p.89-98, 2006.

MUTWEDU, V.B., NYONGESA, A.W., ODUMA, J.A., KITAA, J.M., MBARIA, J.M., Thermal stress causes oxidative stress and physiological changes in female rabbits, **Journal of Thermal Biology** (2020).doi:<https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2020.102780>.
OLIVEIRA, C.M.B.; SAKATA, R.K.; ISSY, A.M.; GEROLA, L.R.; SALOMÃO R. Citocinas e dor. **Rev Bras Anesthesiol**. v. 61, n. 2, p. 255-265, 2011.

OLIVEIRA, J.A.G; CUNHA, V.P.P; FARJATO, R.S.; REZENDE, M.C.R.A. Clareamento dentário x autoestima x autoimagem. **Arch Health Invest.**, São Paulo, v. 3, p. 21-25, 2014.

PERDIGÃO, J.; BARATIERI, L.N.; ARCARI, G.M. Contemporary trends and techniques intooth whitening: a review. **Pract Proced Aesthet Dent**. v.16, e.3, p. 185-92, 2004.

POLUHA, R.L. GROSSMANN, E. Mediadores inflamatórios relacionados às disfunções temporomandibulares artrogênicas. **Brazilian Journal of Pain**. v.1, n. 1, p. 60-65. São Paulo, 2018.

ROBERTO, A.R.; JASSÉ, F.F.; BOAVENTURA, J.M.C.; MARTINEZ, T.C.; RASTELLI, A.N.S.; OLIVEIRA, J.O. Evaluation of tooth color after bleaching with and without light-activation. **Rev odonto cienc.**; v. 26, e. 3, p.:247-52, 2011.

ROSALES, V.P.; IKEDA, K.; HIZAKI, K.; NARUO, T.; NOZOE, S.; ITO, G. Emotional stress and brux- like activity of the masseter muscle in rats. **European Journal of Orthodontics**. v.24, e. 1, p.107–117, 2002.

ROSSI, H.L.; SEE, L.P.; FOSTER, W.; PITAKE, S.; GIBBS, J.; SCHMIDT, B.; MITCHELL, C.H.; ABDUS-SABOOR, I. Evoked and spontaneous pain assessment during tooth pulp injury. **Sci Rep**. v. 10, 2020.

SCHNACKENBERG, C.G.; TABOR, B.L.; STRONG, M.H.; GRANGER, J.P. Inhibition of intrarenal NO stimulates renal secretion through a macula densa-mediated mechanism. **American J Phys**. v. 272, p. 879-886, 1997.

SHIRAZI, I.; YARON, I.; WOLLMAN, Y.; BLUM, M.; CHERNIHOVSKY, T.; JUDOVICH, R.; IAINA, A.; YARON, M. Down regulation of interleukin 1 α 29 production in human osteoarthritic synovial tissue and cartilage cultures by aminoguanidine. **British Medical Journal Ann Rheum Dis**. v. 60, p. 391–394, 2001.

SILVA-COSTA, R.S.G.; RIBEIRO, A.E.L.; ASSUNÇÃO, I.V.; ARAÚJO JR, R.F.; ARAÚJO, A.A.; GUERRA, G.C.B.; BORGES, B.C.D. In-office tooth bleaching with

38% hydrogen peroxide promotes moderate/severe pulp inflammation and production of *IL-1 β* , *TNF- β* , *GPX*, *FGF-2* and osteocalcin in rats. **J. Appl. Oral Sci.** 2018.

SILVA, P.G.B.; MARTINS, J.O.L.; PRAXEDES NETO, R.A.L.; LEMOS, J.V.M.; MACHADO, L.C., ACARLOS, A.C.A.; ALVES, A.P.N.; LIMA, R.A. Tumor necrosis factor alpha mediates orofacial discomfort in an occlusal dental interference model in rats: The role of trigeminal ganglion inflammation. **J Oral Pathol Med.** v.49, n.2, p.169-176, 2020.

SOARES, F.F.; SOUSA, J. A.C.; MAIA, C.C.; FONTES, C.M.; CUNHA, L.G.; FREITAS, A.P. Clareamento em dentes .vitais: uma revisão literária. **Rev Saude Com.** v. 4, n.1, p. 72-84, 2008.

SOARES, D.G.; BASSO, F.G; SCHEFFEL, D.S; HEBLING, J.; COSTA, S. C.A. Responses of human dental Pulp cells after application of a low-concentration bleaching gel to enamel. **Archives of Oral Biology.** v. 60, n. 9, p 1428-1436, 2015.

SOUZA COSTA, C.A.; RIEHL, H.; KINA, J.F.; SACONO, N.T.; HEBLING, J. Human pulp responses to in-office tooth bleaching. **Rev Oral Sugery, Oral medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics.** v. 109, n. 4, p.59-64, 2010.

SUSCHEK, C.V.; SCHNORR, O.; KOLB-BACHOFEN, V. The Role of iNOS in Chronic Inflammatory Processes In Vivo: Is it Damage-Promoting, Protective, or Active at all? **Rev Current Molecular Medicine.** v. 4, n. 7, e. 13, p. 763-775, 2004.

STUEHR, D.J.; CHO, H.J.; KWON, N.S.; WEISE, M.F.; NATHAN, C.F. Purification and characterization of the cytokine-induced macrophage nitric oxide synthase: an FAD- and FMN-containing flavoprotein. **Proc Natl Acad Sci.** v. 88, p. 7773-7777, 1991.

SUSCHEK, C.V.; SCHNORR, O.; KOLB-BACHOFEN, V. The Role of iNOS in Chronic Inflammatory Processes In Vivo: Is it Damage-Promoting, Protective, or Active at all? **Rev Current Molecular Medicine.** v. 4, n. 7, e. 13, p. 763-775, 2004.

WANG, J.; KALHOR, A.; SHIFEIER, L.; CRAWFORD, R.; JIANG-DONG, N.; YIN, X. iNOS expression and osteocyte apoptosis in idiopathic, non-traumatic osteonecrosis. **Acta Orthopaedica.** v. 86, n.1, p. 134-141, 2015.

TIN-OO, M.M.; SADDKI, N.; HASSAN, N. Factors influencing patient satisfaction with dental appearance and treatments they desire to improve aesthetics. **BMC Oral Health.** v. 11, n. 6. 2011.

ZHANG, G-L.; WANG, Y-H.; TENG, H-L.; LIN, Z-B. Effects of aminoguanidine on nitric oxide production induced by inflammatory cytokines and endotoxin in cultured rat hepatocytes. **World J Gastroenterol.** v.7, 2001.

ANEXO A- APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA

CEUA INSTITUTO PARA DESENVOLVIMENTO DA EDUCAÇÃO LTDA IPADE
CENTRO UNIVERSITÁRIO CHRISTUS



Of. No. 036/19

Protocolo da CEUA: 036/19

Pesquisador Responsável: Prof. PAULO GOBERLÂNIO DE BARROS SILVA

Título do Projeto: PAPEL DO ÓXIDO NÍTRICO SINTASE INDUZIDA NAS ALTERAÇÕES INFLAMATÓRIAS DA POLPA DENTAL DE RATAS SUBMETIDOS A CLAREAMENTO DENTAL COM PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO

Levamos ao conhecimento de V. Sa que a Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto para Desenvolvimento da Educação LTDA – IPADE considerou **APROVADO** o projeto supracitado na reunião do dia 28 (vinte e oito) de outubro de 2019.

Descrição do animal utilizado:

Espécie:	Rattus norvegicus	Número Amostral:	72
----------	-------------------	------------------	----

Relatórios parciais e finais devem ser apresentados ao CEUA/Instituto para Desenvolvimento da Educação LTDA - IPADE ao término do estudo, período máximo 28/10/2020.

Fortaleza, 28 de Outubro de 2019.

Olga Vale Oliveira Machado
Coordenadora

CEUA/Instituto para Desenvolvimento da Educação LTDA - IPADE

Campus Benfica
 Rua Princesa Isabel, 1920
 60015-001 - Fortaleza CE
 Fone: 85 3214.8770 - 3214.8771

Campus Giannino Torres
 Rua Manoel Ribeiro, 670
 60135-460 - Fortaleza CE
 Fone: 85 3257.2920/1494 - 85 3272.6262

Campus O. Luis
 Av. Dom Luís, 911
 60160-230 - Fortaleza CE
 Fone: 85 3457.5301 - Fax: 85 3457.5374

Campus Parque Ecológico
 Rua João Adolfo Gurgel, 133
 60192-345 - Fortaleza CE
 Fone: 85 3265.8100 - Fax: 85 3265.8110