



**UNIVERSIDADE CHRISTUS
MESTRADO EM CIÊNCIAS ODONTOLÓGICAS**

SUELY BEZERRA DOS SANTOS

**IMPACTO DO USO SISTÊMICO DO METOTREXATO NA RESPOSTA
INFLAMATÓRIA DA POLPA DENTÁRIA DE RATAS SUBMETIDAS AO
CLAREAMENTO COM PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO**

**FORTALEZA
2026**

SUELY BEZERRA DOS SANTOS

**IMPACTO DO USO SISTÊMICO DO METOTREXATO NA RESPOSTA
INFLAMATÓRIA DA POLPA DENTÁRIA DE RATAS SUBMETIDAS AO
CLAREAMENTO COM PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas da Universidade Christus, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Odontológicas. Linha de pesquisa: biomateriais odontológicos.

Orientador: Prof. Dr. Jiovane Rabelo Neri.

Coorientador: Prof. Dr. Dr. Paulo Goberlânio de Barros Silva.

FORTALEZA

2026

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)

B574i Bezerra Dos Santos, Suely.
Impacto do uso sistêmico do metotrexato na resposta inflamatória da polpa dentária de ratas submetidas ao clareamento com peróxido de hidrogênio / Suely Bezerra Dos Santos. - 2026.
31 f. : il. color.

Dissertação (Mestrado) - Centro Universitário Christus - Unichristus, Mestrado em Ciências Odontológicas, Fortaleza, 2026.
Orientação: Profa. Dra. Jiovane Rabelo Neri.
Coorientação: Profa. Dra. Paulo Goberlânio de Barros Silva.
Área de concentração: Ciências Odontológicas.

1. Metotrexato. 2. Polpa dentária. 3. Clareamento. I. Título.

CDD 617.6

SUELY BEZERRA DOS SANTOS

**IMPACTO DO USO SISTÊMICO DO METOTREXATO NA RESPOSTA
INFLAMATÓRIA DA POLPA DENTÁRIA DE RATAS SUBMETIDAS AO
CLAREAMENTO COM PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas da Universidade Christus, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Odontológicas. Linha de pesquisa: biomateriais odontológicos.

Aprovada em: 26 / 02 /2026.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Giovane Rabelo Neri (Orientador)
Universidade Christus

Prof. Dra. Maria Elisa Martins Moura
Universidade Christus

Prof. Dra. Nara Sousa Rodrigues
Universidade Federal do Ceará

Dedico este trabalho ao meu marido, Emerson Barbosa, que nunca mediu esforços em prol dos meus estudos, oferecendo-me apoio incansável e incentivo constante ao longo de toda essa jornada.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a **Jeová**, meu Deus, por me conduzir no caminho em que devo andar, com alegria e entusiasmo. Sou grata pela oportunidade de crescimento profissional exercendo aquilo que amo e por Sua ajuda constante na superação de cada obstáculo.

Aos meus pais. À minha querida mãe, **Neuma** (*in memoriam*), exemplo de bom humor e alegria, que, mesmo ausente, continua sendo minha fonte de inspiração. Ao meu pai, **Vicente**, que me ensinou, com seu próprio exemplo, a trabalhar com dedicação e a sempre ajudar o próximo, sem medir esforços. Aos meus queridos irmãos **Evanildo, Normando** (*in memoriam*), **Norma e Marcelo** por visualizarem um futuro positivo para mim, mesmo quando era impossível.

Ao meu marido, **Emerson Wendel**, pelo amor e companheirismo, por caminhar verdadeiramente ao meu lado e se fazer presente em cada momento. Sou profundamente grata por sua paciência, incentivo e apoio incondicional. Obrigada por ser meu refúgio em todos os momentos.

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Jiovanne Rabelo Neri**, exemplo inspirador de profissional e ser humano, por quem nutro profundo respeito e admiração. Agradeço por me acompanhar de forma exemplar ao longo dos últimos dois anos na elaboração deste trabalho, contribuindo com paciência, orientação e dedicação para a obtenção deste título.

Ao meu coorientador, **Prof. Dr. Paulo Goberlânio**, pela valiosa contribuição na condução deste trabalho, pela orientação criteriosa e disponibilidade ao longo de todo o processo, que foram fundamentais para o desenvolvimento e a conclusão desta pesquisa.

Aos alunos da Iniciação Científica, **Laís, Luana, André Luís, Jonas e Yohanna**, que dedicaram tempo, esforço e comprometimento à condução desta pesquisa, contribuindo de forma responsável, cuidadosa e exemplar para a realização de cada etapa do estudo.

Ao **corpo docente** da Unichristus, que me acompanhou desde a graduação até o mestrado, compartilhando generosamente seus conhecimentos e inspirando-me, como aluna e como profissional, a buscar sempre a excelência, sem jamais me nivelar por modelos que não representem os valores e a ética que a profissão exige.

Aos **amigos e colegas de turma** que estiveram ao meu lado, vibrando comigo a cada conquista e que, por meio de um simples gesto ou palavra, aliviaram minhas preocupações e anseios ao longo desta trajetória, em especial a **Iracilda, Igor, Glaubiane, Aldenir, Ellen, Johana e Mirian, Caio, Sheyla e Suely**. A todos, minha mais sincera gratidão.

Sou muito grata às escolas Heráclito de Castro e Silva e Mariano Martins, reconheço o importante papel que essas instituições tiveram na minha base educacional. E principalmente a **Universidade Christus**, pelo padrão de excelência no ensino oferecido, pelo apoio e incentivo na efetivação desse sonho. Ninguém cresce sozinho.

*“Para que todas as pessoas vejam e saibam, prestem atenção e compreendam que
a mão de Jeová fez isso e que o Santos de Israel o realizou”*

Isaías 41:20

RESUMO

As doenças autoimunes apresentam prevalência crescente, sendo o metotrexato (MTX) amplamente utilizado no controle da inflamação. O clareamento dental com peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é um procedimento estético conservador, porém capaz de gerar estresse oxidativo e resposta inflamatória pulpar. Considerando que pacientes em uso de MTX frequentemente buscam procedimentos odontológicos eletivos, torna-se relevante investigar a influência desse fármaco na resposta inflamatória pulpar frente ao clareamento dental. Dessa forma, o presente estudo teve como objetivo investigar a influência do uso sistêmico do MTX no processo inflamatório da polpa dentária induzido pelo clareamento com H_2O_2 , contribuindo para o entendimento dos possíveis efeitos desse medicamento sobre a resposta pulpar. Para isso, 60 ratas da linhagem Wistar, foram aleatoriamente divididas em grupo sham (GS) controle negativo, grupo controle (GC) submetido a clareamento com H_2O_2 e tratado com solução salina (0,1ml/kg) e um grupo teste (GT_{MTX}) submetido a clareamento com H_2O_2 e tratado com 7.5mg/kg de MTX via gavagem. A administração de solução salina ou MTX foi iniciada 3 dias antes e permaneceu até o final do protocolo. Após anestesia, foi aplicada uma barreira gengival nos molares superiores bilateralmente para aplicação do gel clareador de H_2O_2 40% nos dentes isolados (0,02 ml por dente) por 15 minutos. Após 24h, 48h e 7 dias do clareamento os animais foram eutanasiados para análise histomorfométrica da polpa (mensuração de área de polpa, de vasos ectásicos, contendo fibrina no seu interior). Teste ANOVA/Bonferroni foi utilizado ($p < 0,05$, GraphPad Prism 5.0). A área média dos vasos sanguíneos da polpa dentária das ratas foi maior após 24h no grupo $GC_{H_2O_2}$ ($p = 0.002$). Após 48 horas, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos. O percentual da área da polpa preenchida por vasos sanguíneos da polpa dentária das ratas foi maior após 24h no grupo $GC_{H_2O_2}$ ($p < 0.001$). Após 48 horas, não foram observadas diferenças entre os grupos. Após 24h do clareamento o grupo $GC_{H_2O_2}$ apresentou aumento no percentual de vasos ectásicos ($p = 0.011$) e após 48h não foram observadas diferenças significativas entre os grupos. E com relação ao percentual de vasos exibindo fibrina no interior da polpa dentária de ratas submetidas a clareamento dental com H_2O_2 , não houve diferença estatística significativa entre os grupos estudados após 24 e 48 horas ($p = 0.087$). O metotrexato foi capaz de reverter o processo de vasodilatação e ectasia vascular nas primeiras 24 horas, minimizando as alterações inflamatórias induzidas pelo clareamento dental. Após 48 horas, essas alterações mostraram-se ainda mais atenuadas.

Palavras-chave: metotrexato; polpa dentária; clareamento.

ABSTRACT

Methotrexate (MTX) is a synthetic folic acid analogue widely used in the treatment of inflammatory, autoimmune, and antineoplastic diseases. In parallel, dental bleaching performed with hydrogen peroxide (H_2O_2) is among the most commonly used esthetic procedures in dental practice. However, H_2O_2 based bleaching agents may promote the release of reactive oxygen species capable of diffusing through dentin and reaching the pulp tissue, potentially inducing a mild and transient inflammatory response characterized as reversible pulpitis. Considering that patients undergoing MTX therapy maintain their daily routines and frequently seek dental care, it becomes relevant to understand the influence of this drug on the pulpal inflammatory response to dental bleaching. Therefore, the present study aimed to investigate the influence of systemic MTX use on the inflammatory process of dental pulp induced by H_2O_2 bleaching. For this purpose, 60 Wistar rats were randomly divided into a sham group (SG), negative control; a control group (CG), subjected to bleaching with H_2O_2 and treated with saline solution (0.1 ml/kg); and a test group (TG_{MTX}), subjected to bleaching with H_2O_2 and treated with 7.5 mg/kg of MTX via gavage. Saline or MTX administration was initiated three days prior to bleaching and maintained until the end of the experimental protocol. After anesthesia, a gingival barrier was applied bilaterally to the maxillary molars, followed by the application of a 40% H_2O_2 bleaching gel to the isolated teeth (0.02 mL per tooth) for 15 minutes. At 24 hours, 48 hours, and 7 days after bleaching, the animals were euthanized for histomorphometric analysis of the pulp, including measurements of pulp area and the presence of ectatic vessels and fibrin-containing vessels. Data were analyzed using ANOVA followed by the Bonferroni post hoc test ($p < 0.05$; GraphPad Prism 5.0). showed that the mean area of dental pulp blood vessels was significantly higher at 24 hours in the $GC_{H_2O_2}$ group ($p = 0.002$). After 48 hours, no statistically significant differences were observed among the groups. The percentage of pulp area occupied by blood vessels was also higher at 24 hours in the $GC_{H_2O_2}$ group ($p < 0.001$). After 48 hours, no differences were observed between the groups. At 24 hours after bleaching, the $GC_{H_2O_2}$ group exhibited an increased percentage of ectatic vessels ($p = 0.011$), whereas no significant differences were observed after 48 hours. Regarding the percentage of vessels containing fibrin within the dental pulp, no statistically significant differences were detected among the groups at either 24 or 48 hours ($p = 0.087$). Methotrexate was able to reverse the vasodilation and vascular ectasia observed within the first 24 hours, minimizing the inflammatory alterations induced by dental bleaching. After 48 hours, these changes were even further attenuated.

Keywords: methotrexate; dental pulp; tooth bleaching.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Modelo de análise das escalas de Grimace para avaliação dos níveis de dor/sofrimento em animais em experimentação Imagem de Escalas de Grimace.....	19
Figura 2 - plano de corte histológico para análise histomorfométrica da polpa dentária de ratas submetidos a modelo de movimentação ortodôntica com diferentes forças.....	19
Figura 3 - Aspecto histológico do plano de corte da polpa dentária de ratas.....	20
Figura 4 - Área média dos vasos sanguíneos da polpa dentária de ratas submetidas a clareamento dental com peróxido de hidrogênio e tratados ou não com metotrexato.....	21
Figura 5 - Percentual da área da polpa dentária preenchida por vasos sanguíneos em ratas submetidas ao clareamento dental com peróxido de hidrogênio, tratadas ou não com metotrexato.....	22
Figura 6 - Percentual de vasos ectásicos de polpas dentárias de ratas submetidas a clareamento dental com peróxido de hidrogênio e tratados ou não com metotrexato.....	23
Figura 7 - Percentual de vasos sanguíneos dentários com fibrina de ratas submetidas a clareamento dental com peróxido de hidrogênio e tratados ou não com metotrexato.....	24

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Distribuição amostral dos animais submetidos a modelo de administração de solução salina, metotrexato e clareamento dental.....	17
Quadro 2 - Escala de Grimace com parâmetros de avaliação de dor e sofrimento.....	18

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

MTX	Metotrexato
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
CH ₆ N ₂ O ₃	Peróxido de carbamida
ERO	Espécies reativas de oxigênio
RANK-L	Receptor ativador do fator nuclear kappa B-ligante Universidade Christus
IL-1b	Interleucina 1b
UNICHRISTUS	Universidade Christus
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
GS	Grupo sham
GC	Grupo controle clareado com peróxido de hidrogênio
GT _{MTX}	Grupo teste com metotrexato
Na ₂ HPO ₄	Formol tamponado com fosfato de sódio dibásico
NaH ₂ PO ₄	Formol tamponado com fosfato de sódio monobásico
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL	12
2	OBJETIVO.....	15
2.1	Objetivo Geral.....	15
2.2	Objetivos Específicos.....	15
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	16
3.1	Abordagem ética e Tamanho da Amostra.....	16
3.2	Cálculo Amostral.....	16
3.3	Grupos de Estudo.....	16
3.4	Desenho Experimental.....	17
3.5	Processamento e análise histológica da polpa dentária.....	17
3.6	Análise estatística.....	19
4	RESULTADOS.....	20
5	DISCUSSÃO.....	24
6	CONCLUSÃO.....	26
	REFERÊNCIAS.....	27
	ANEXOS.....	31

1 INTRODUÇÃO

As doenças autoimunes constituem um importante problema de saúde pública, com prevalência crescente ao longo dos anos, que impactam diretamente a qualidade de vida dos indivíduos. Essas condições são caracterizadas pela perda da tolerância imunológica, resultante da interação entre fatores genéticos e ambientais, o que leva à ativação dos linfócitos T e B, que passam a mediar danos a um ou mais órgãos ou tecidos específicos (ANAYA, M. *et al.*, 2009). O tratamento dessa condição visa à redução dos sintomas que comprometem a qualidade de vida dos pacientes. Para esse fim, são empregados fármacos voltados tanto ao controle sintomático, como os anti-inflamatórios não esteroidais, quanto à modulação da evolução da doença. Nesse cenário, o metotrexato (MTX) destaca-se como a principal opção terapêutica entre os fármacos modificadores do curso da doença (PEREIRA *et al.*, 2009; BRASIL, 2017).

O MTX é um fármaco sintético semelhante ao ácido fólico, amplamente utilizado na prática clínica para o tratamento de doenças inflamatórias e autoimunes, a exemplo da artrite reumatoide e da psoríase (DE EUZEBIO, ARMARIO-HITA & DE MIQUEL, 2014; KRAUSE *et al.*, 2024). Seus efeitos anti-inflamatórios são atribuídos a modulação de vias metabólicas envolvidas na resposta inflamatória, destacando-se o aumento dos níveis de adenosina (que influencia diretamente na produção de células T intra e extracelular, um mediador endógeno com reconhecido efeito anti-inflamatório (CRONSTEIN & AUNE, 2020; ARRUDA, YPIRANGA & MARTINS, 2004). Estudos clínicos demonstram que, o MTX é considerado eficaz quando administrado em baixas doses, e na maioria dos casos, apresenta baixa incidência de efeitos colaterais graves (HOFFMEISTER, 1983). Ele está entre os principais fármacos antirreumáticos de primeira escolha no tratamento da artrite reumatoide, atuando por meio da diminuição da produção de citocinas pró-inflamatórias. (Chen *et al.*, 2022).

Além disso o MTX é amplamente utilizado na quimioterapia contra o câncer, seja de forma isolada ou em combinação com outros medicamentos e modalidades terapêuticas. Suas ações têm sido extensivamente estudadas tanto em humanos quanto em modelos animais. Estudos realizados por Shklar demonstraram que o metotrexato pode causar alterações na mucosa oral de animais experimentais, resultando em atrofia epitelial e ulceração (BOYLE & BESSEY, 1940; SHKLAR, 1968).

Paralelamente, o aumento da expectativa de vida da população em geral, incluindo pacientes em uso desse fármaco, tem levado um número crescente de indivíduos aos consultórios odontológicos em busca de procedimentos estéticos. No cenário brasileiro atual,

essa demanda é intensificada pela valorização crescente da estética do sorriso, tornando o clareamento dental um dos procedimentos mais procurados. Nesse contexto, torna-se relevante considerar que o clareamento dental, amplamente indicado para o tratamento das descolorações dentárias, é uma abordagem eficaz, conservadora e minimamente invasiva, com resultados clínicos previsíveis e amplamente respaldados pela literatura científica (MOLLICA *et al.*, 2010; MATIS *et al.*, 2015). Atualmente, o tratamento clareador em dentes vitais é realizado com a aplicação de diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) ou peróxido de carbamida (CH₆N₂O₃). Ambos estão disponíveis comercialmente para uso caseiro ou profissional sob supervisão de um cirurgião dentista (CARVALHO *et al.*, 2009, GUTH *et al.*, 2012).

Quando o gel clareador entra em contato com a superfície do dente, o peróxido de hidrogênio reage e libera espécies reativas de oxigênio (ERO), que se difundem pelos espaços intersticiais altamente permeáveis presentes no esmalte e pelos túbulos dentinários. Essas moléculas reativas degradam as moléculas cromóforas presentes na dentina, dividindo-as em moléculas cada vez menores, alterando assim a percepção da cor quando a luz é refletida na estrutura dos dentes, conseqüentemente, clareando-os (SILVA *et al.*, 2020).

Entretanto, essas mesmas ERO podem penetrar até a polpa e causa estresse oxidativo celular. Alguns sinais e sintomas podem estar associados a esse processo oxidativo como inflamação, dor, redução da capacidade de proliferação e regeneração tecidual e necrose pulpar. A sensibilidade trans e pós clareamento dentário pode ser uma resposta do tecido pulpar a esse estresse oxidativo, onde os nervos dentinários ficam mais sensíveis devido à inflamação e à reação dos tecidos (CINTRA *et al.*, 2013; DIETRICH *et al.*, 2021).

Em estudo realizado por Sato *et al.* (2012) foi demonstrado que o peróxido de hidrogênio tem efeito citotóxico, podem causar danos aos tecidos além de gerar um aumento na atividade de citocinas e metaloproteinases inflamatórias associado ao uso de técnicas de clareamento dental. Esses efeitos também podem afetar os níveis de marcadores de destruição óssea, uma vez que esses agentes podem se difundir para os tecidos periodontais. Um dos marcadores mais importantes de destruição óssea estudados é o receptor ativador do fator nuclear kappa B-ligante (RANK-L), que também está associado à regulação do processo de reabsorção radicular (KIKUTA *et al.*, 2015; NAKANO *et al.*, 2010). A interleucina 1b (IL-1b) desempenha um papel central nas respostas imunes e inflamatórias, bem como no processo de remodelação óssea. Esta citocina está presente na maioria dos processos inflamatórios e seu aumento tem sido associado a vários processos patológicos, como periodontite e perda óssea marginal (KORNMAN *et al.*, 1997).

Considerando que o tratamento com metotrexato tem contribuído significativamente para a melhora das condições de saúde e para o aumento da expectativa e da qualidade de vida dos pacientes, esses indivíduos tendem a manter suas atividades cotidianas e a buscar cuidados odontológicos eletivos, incluindo procedimentos estéticos como o clareamento dentário. No entanto, apesar da ampla utilização do metotrexato e da crescente demanda por clareamento dental, observa-se uma lacuna na literatura científica quanto à influência desse fármaco sobre a resposta inflamatória da polpa dentária frente à agressão química promovida pelos agentes clareadores à base de peróxido de hidrogênio. Dessa forma, torna-se relevante investigar se o uso sistêmico do metotrexato pode interferir nos mecanismos inflamatórios pulparens desencadeados pelo clareamento dentário, contribuindo para uma prática clínica mais segura e embasada em evidências.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a influência do uso sistêmico do metotrexato no processo inflamatório da polpa dentária após clareamento dentário com peróxido de hidrogênio a 40%, através de um estudo com modelo animal.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar histologicamente a influência do clareamento dental com peróxido de hidrogênio na polpa dental de ratas da linhagem Wistar.
- Avaliar as alterações do comportamento animal em ratas tratados com clareamento dentário com peróxido de hidrogênio.
- Avaliar a influência do clareamento dentário com peróxido de hidrogênio na variação ponderal de ratas da linhagem Wistar.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Abordagem Ética e Tamanho da Amostra

O presente estudo foi realizado após aprovação pela comissão ética de uso de animais da Universidade Christus (UNICHRISTUS) com protocolo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) 028/24 (ANEXO I). Foram utilizadas 60 ratas fêmeas pesando entre 180 e 220 gramas, da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*), obtidos do Biotério Central do referido centro. Durante a realização dos experimentos, todos os esforços possíveis foram utilizados para minimizar o sofrimento dos animais. Os mesmos foram abrigados à 23° C em ciclo luz-escuro de 12 horas, com acesso a água e alimento *ad libitum* em gaiolas de polipropileno em número de 04 animais por gaiola.

3.2 Cálculo Amostral

O cálculo amostral foi baseado no estudo de PINTO et al. (2024) que observou que dois dias após clareamento dentário a polpa dentária de ratas tratadas com peróxido de hidrogênio apresentam aumento significativo do percentual de área de polpa preenchida por vasos sanguíneos comparado a um grupo não clareado ($0,158 \pm 0,062$ vs $0,048 \pm 0,037\%$), estima-se necessário avaliar dez ratas por grupo por dia a fim de obter uma amostra que represente com 90% de poder e 95% de confiança a hipótese alternativa deste estudo (teste t de Student).

3.3 Grupos de Estudo

Os animais (180-200g) foram mantidos com água e ração *ad libitum*, em ciclo claro-escuro de 12h, com temperatura de 20-25°C e pesados diariamente. Os animais foram aleatoriamente divididos (comando “Aleatório”, Microsoft Excel, 2010, Microsoft Corporation®) em três grupos:

- Grupo sham (GS): grupo controle negativo não submetido a tratamento clareador tratado com solução salina 0,1ml/kg
- Grupo controle (GC_{H2O2}): grupo submetido a tratamento clareador tratado com solução salina 0,1ml/kg
- Grupo teste (GT_{MTX}): submetido a tratamento clareador e bloqueio farmacológico de Metotrexato 7.5 mg/kg (PINTO et al., 2024).

A administração de solução salina ou metotrexato foi realizada por gavagem iniciando três dias antes do clareamento dental e permanecendo diariamente até o final do protocolo conforme descrito por PINTO et al., (2024). Cada grupo contou com dois momentos de eutanásia, após 24h e 48h e foram utilizadas 10 ratas por grupo por dia de eutanásia, sendo utilizado um total de 60 ratas para este experimento. Dessa forma, a quantidade de administrações de metotrexato totalizará, respectivamente, três, quatro e 10 administrações dependendo dos dias de eutanásia.

Quadro 1 - Distribuição amostral dos animais submetidos a modelo de administração de solução salina, metotrexato e clareamento dental.

DIAS DE EUTANÁSIA	GRUPOS			TOTAL
	SHAM	SALINA	METOTREXATO	
24 HORAS	N=10	N=10	N=10	N=30
48 HORAS	N=10	N=10	N=10	N=30
TOTAL	N=20	N=20	N=20	N=60

3.4 Desenho Experimental

Foi realizado o protocolo de clareamento dentário proposto por PINTO et al., (2024) 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 clipe ajustado como abridor de boca e uma barreira gengival foi aplicada nos molares superiores dos animais bilateralmente (Top Dam; FGM, Joinville, SC, Brasil) para aplicação do gel clareador de H₂O₂ 40% Opalescence Boost (Ultradent Products Inc., South Jordan, UT, EUA) nos dentes isolados (0,02 ml por dente) por 15 minutos. Os animais do grupo controle negativo também foram anestesiados, mas não foram submetidos ao gel clareador.

Após 24h e 48h os animais foram eutanasiados por sobredose anestésica de xilazina e quetamina (50 mg/kg e 150mg/kg respectivamente) e foram coletadas as maxilas para fixação em formol neutro 10% e processamento histológico.

3.5 Processamento e análise histológica da polpa dentária

Após eutanásia as amostras foram fixadas em formol tamponado 10% (Na₂HPO₄ dibásico anidro = 6,5g; NaH₂PO₄ monobásico = 4g; Formol para análise = 100mL; Água

destilada = quantidade suficiente para 1L) por 48h e seguiram para processamento histológico. As amostras foram descalcificadas (suspensão) em solução 10% de Ácido Etilenodiaminotetracético (EDTA) (pH 7.3; NaOH, PA) durante 30 dias para confecção de lâminas histológicas e análise qualitativa por microscopia de luz convencional.

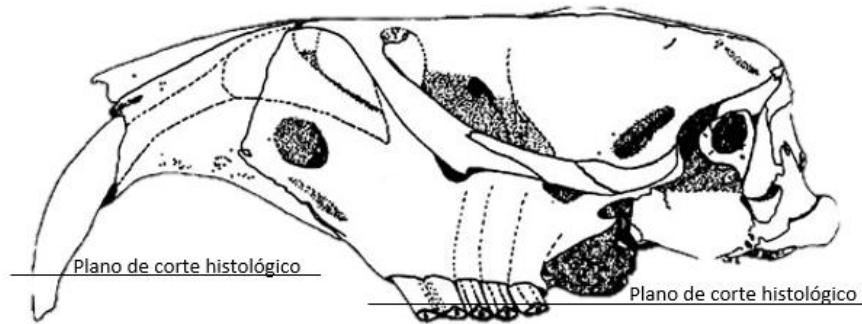


Figura 2: plano de corte histológico para análise histomorfométrica da polpa dentária de ratas submetidos a modelo de movimentação ortodôntica com diferentes forças. Imagem adaptada de <http://gogopixlibrary.com>. Acesso em 15 de abril de 2018.

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, 3µm). Tanto as amostras de incisivo como as hemimaxilas o plano de clivagem foi paralelo à linha oclusal para cortes transversais (Figura 4).

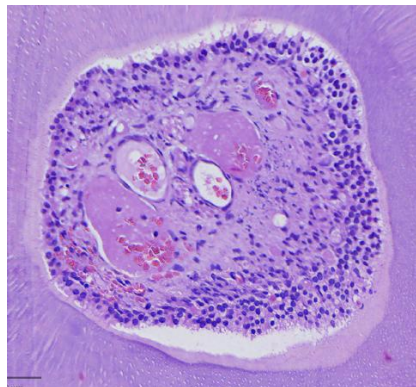


Figura 3: Aspecto histológico do plano de corte da polpa dentária de ratas.

Os cortes histológicos foram realizados em micrótomo semi-automático (Leica®) até atingir o plano em que em ambos os espécimes possa ser visualizada a câmara pulpar (Figura 3). As lâminas foram escaneadas utilizando o sistema Motic e todos os molares tiveram sua área total da polpa medida por meio do comando “freehand selections”, bem como a área de cada

vaso sanguíneo, para cálculo da média de área de vaso e do percentual de polpa preenchida por vasos para análise estatística. Adicionalmente, os vasos foram classificados como ectásicos, contendo fibrina ou sem alterações microscópicas para cálculo de percentual de vasos ectásicos e contendo fibrina em seu interior.

3.6 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.

4. RESULTADOS

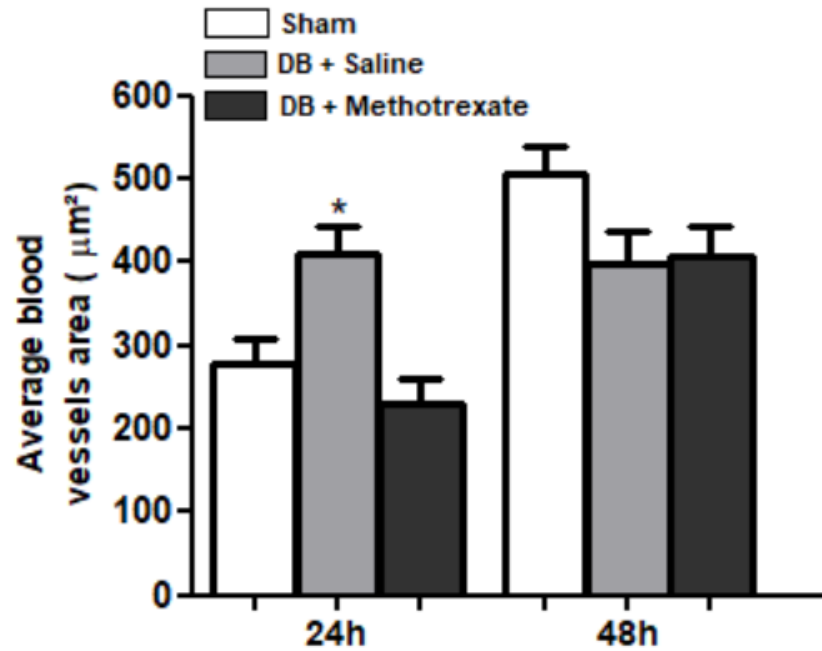


Figura 4: Área média dos vasos sanguíneos da polpa dentária de ratas submetidas a clareamento dental com peróxido de hidrogênio e tratados ou não com metotrexato.

* $p < 0,05$, versus demais grupos no mesmo dia (teste ANOVA/Tukey, média \pm DP).

A área média dos vasos sanguíneos da polpa dentária de ratas foi significativamente maior no grupo submetido ao clareamento dental quando comparado aos grupos sham e tratado com metotrexato. A área média dos vasos foi calculada pela soma das áreas individuais dos vasos sanguíneos analisados, dividida pelo número total de vasos avaliados. Após 48 horas, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos ($p=0.002$).

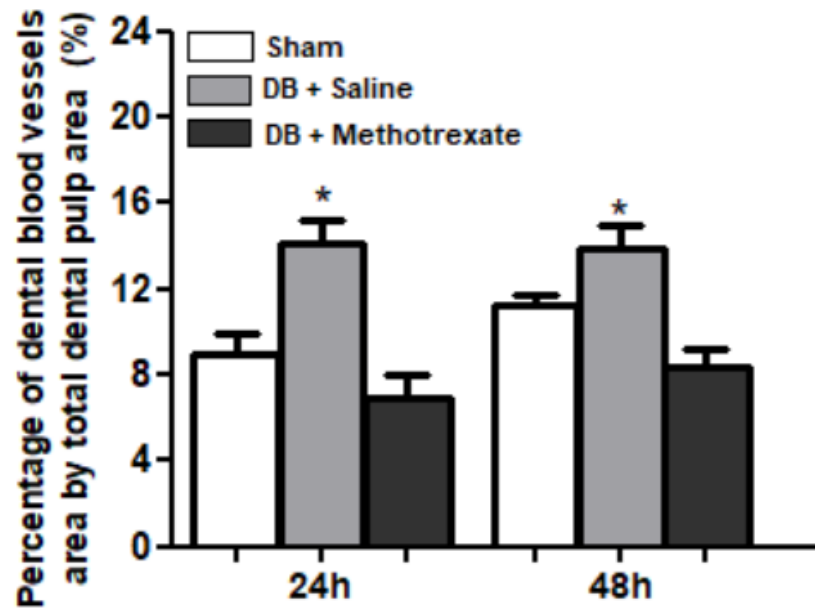


Figura 5: Percentual da área da polpa dentária preenchida por vasos sanguíneos em ratas submetidas ao clareamento dental com peróxido de hidrogênio, tratadas ou não com metotrexato. * $p < 0,05$, versus demais grupos no mesmo dia (teste ANOVA/Tukey, média \pm DP).

Após 24 horas, as ratas submetidas ao clareamento dental apresentaram percentuais significativamente maiores da área da polpa dentária preenchida por vasos sanguíneos quando comparadas aos grupos sham e ao grupo clareado tratado com metotrexato. Nota-se que o tratamento com metotrexato reduziu a ectasia vascular, resultando em valores semelhantes aos observados no grupo sham. Após 48 horas, embora não tenham sido observadas diferenças entre os grupos, o grupo tratado apenas com solução salina manteve percentuais significativamente mais elevados em relação aos grupos sham e tratado com metotrexato, corroborando os achados relacionados ao aumento do número de vasos ectásicos ($p < 0.001$).

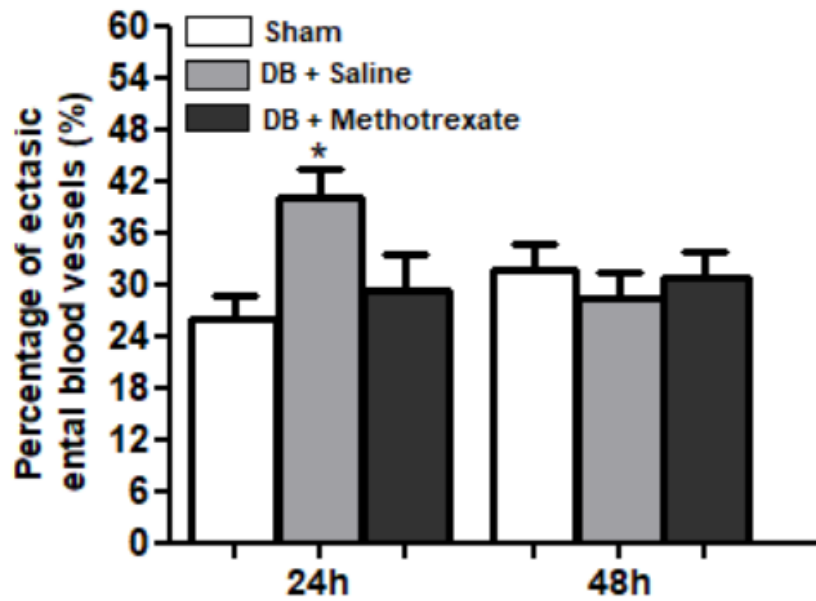


Figura 6: Percentual de vasos ectásicos de polpas dentárias de ratas submetidas a clareamento dental com peróxido de hidrogênio e tratados ou não com metotrexato.

* $p < 0,05$, versus demais grupos no mesmo dia (teste ANOVA/Tukey, média \pm DP).

O percentual de vasos ectásicos na polpa dentária de ratas submetidas a clareamento dental com peróxido de hidrogênio demonstrou aumento significativo após 24 horas no grupo clareado. Esse aumento foi estatisticamente significativo em comparação tanto ao grupo sham quanto ao grupo tratado com metotrexato. Os resultados indicam que o clareamento induz ectasia vascular associada ao processo inflamatório, enquanto o metotrexato exerce efeito modulador, atenuando essa resposta. Após 48 horas, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos, o que é compatível com a resolução parcial da fase inflamatória aguda, predominantemente presente nas primeiras 24 horas ($p=0.011$).

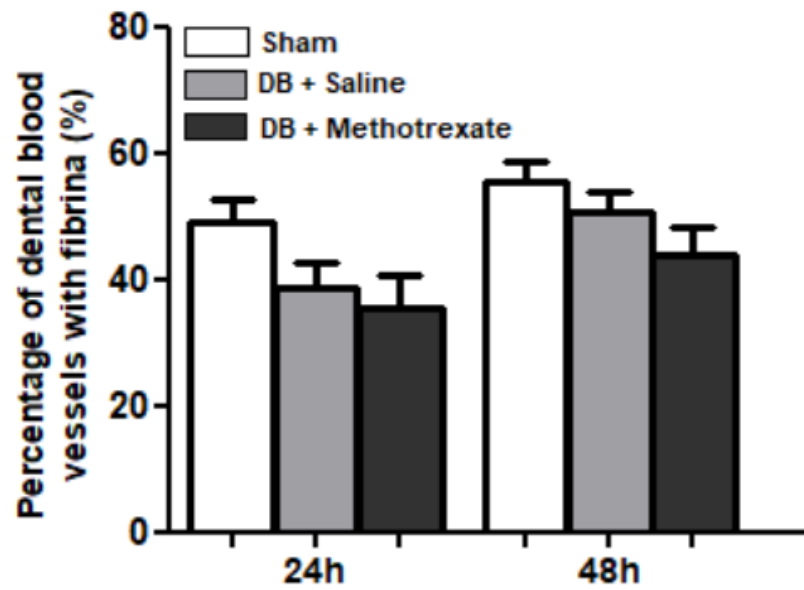


Figura 7: Percentual de vasos sanguíneos dentários com fibrina de ratas submetidas a clareamento dental com peróxido de hidrogênio e tratados ou não com metotrexato.

* $p < 0,05$, versus demais grupos no mesmo dia (teste ANOVA/Tukey, média \pm DP).

E com relação ao percentual de vasos exibindo fibrina no interior da polpa dentária de ratas submetidas a clareamento dental com peróxido de hidrogênio, não houve diferença estatística significativa entre os grupos estudados após 24 e 48 horas ($p = 0,087$).

5. DISCUSSÃO

O MTX é amplamente descrito na literatura como um fármaco com propriedades anti-inflamatórias e imunomoduladoras, atuando na redução da resposta inflamatória tecidual. Estudos prévios demonstram que o metotrexato é capaz de inibir a vasodilatação associada a processos inflamatórios, contribuindo para a diminuição do extravasamento vascular e do edema tecidual (CRONSTEIN & AUNE, 2020).

Além disso, diversos trabalhos demonstram que o MTX reduz a migração e ativação de neutrófilos, células-chave na fase inicial da inflamação aguda. A diminuição da migração neutrofílica está diretamente associada à atenuação da liberação de mediadores inflamatórios e à redução das alterações vasculares características do processo inflamatório (CRONSTEIN *et al.*, 1991). De forma semelhante, no presente estudo, a redução da dilatação vascular observada nos grupos tratados com MTX sugere um efeito modulador sobre a resposta inflamatória pulpar, reforçando a concordância entre nossos resultados e os dados previamente publicados.

O clareamento dental tem sido amplamente utilizado no tratamento das descolorações dentárias por se tratar de uma abordagem eficaz e minimamente invasiva (MOLLICA *et al.*, 2010). Contudo, apesar de seus reconhecidos benefícios estéticos, o procedimento pode desencadear alterações pulpares que variam de uma inflamação leve e reversível até quadros mais severos, como a necrose pulpar. Esses efeitos estão relacionados à difusão do H₂O₂ através dos tecidos dentários, a qual favorece a liberação de mediadores bioquímicos envolvidos na resposta inflamatória, promovendo aumento da permeabilidade vascular e vasodilatação no tecido pulpar (GALLINARI *et al.*, 2019).

A inflamação pulpar desempenha papel fundamental na sensibilidade decorrente do clareamento dental, uma vez que a ativação de componentes neuroinflamatórios tende a intensificar esse processo. Diversos trabalhos demonstram que o MTX reduz a migração e ativação de neutrófilos, células-chave na fase inicial da inflamação aguda (SUAREZ *et al.*, 1987). Quando há redução da migração de neutrófilos, ocorre uma menor liberação desses mediadores inflamatórios e ocorre a redução das alterações vasculares características do processo inflamatório. De forma semelhante, no presente estudo, a redução da dilatação vascular observada nos grupos tratados com metotrexato sugere um efeito modulador sobre a resposta inflamatória pulpar, reforçando a concordância entre nossos resultados e os dados previamente publicados.

Adicionalmente, evidências experimentais indicam que o MTX é capaz de reduzir a produção de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , IL-1 β e IL-6, as quais desempenham

papel fundamental na indução da vasodilatação e no aumento da permeabilidade vascular (AGGARWAL & MISRA, 2003). Dessa forma, é plausível supor que, no presente estudo, a diminuição da vasodilatação e da ectasia vascular observada nos animais tratados com MTX esteja relacionada, ao menos em parte, à redução desses mediadores inflamatórios, contribuindo para a modulação da inflamação pulpar induzida pelo clareamento dental.

Assim, considerando as limitações inerentes aos modelos experimentais *in vivo*, cujos resultados não podem ser diretamente aplicados para modelos humanos, os achados deste estudo indicam que o tratamento com MTX modula a resposta inflamatória da polpa dentária, atenuando as alterações inflamatórias induzidas pelo clareamento dental. Dessa forma, pacientes em uso de MTX poderiam, teoricamente, submeter-se ao clareamento dental com menor intensidade de sensibilidade pós-operatória quando comparados a pacientes normossistêmicos.

6. CONCLUSÃO

O uso sistêmico do metotrexato influenciou a resposta inflamatória da polpa dentária após o clareamento dental com peróxido de hidrogênio a 40%, promovendo redução da vasodilatação e da ectasia vascular nas primeiras 24 horas, com atenuação ainda mais evidente após 48 horas. Assim, no modelo animal avaliado, o metotrexato modulou a inflamação pulpar induzida pelo clareamento dental.

REFERÊNCIAS

- AGGARWAL, A.; MISRA, R. Methotrexate inhibits interleukin-6 production in patients with juvenile rheumatoid arthritis. **Rheumatology International**, v. 23, n. 3, p. 134–137, maio 2003. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12739045/> Acesso em: 30 mar. 2026.
- ANAYA, J. M. *et al.* Calidad de vida en esclerosis múltiple y otras enfermedades crónicas autoinmunes y no autoinmunes. **Revista de Neurología**, v. 48, n. 05, p. 225, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.33588/rn.4805.2008288> Acesso em: 30 mar. 2026.
- ARRUDA, L.; YPIRANGA, S.; MARTINS, G. A. Tratamento sistêmico da psoríase - Parte II: Imunomoduladores biológicos. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 79, n. 4, p. 393–408, ago. 2004. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/abd/a/tvTRTqLGLXQY5q4cVgZhtsy/?lang=pt>. Acesso em: 31 mar. 2026.
- BOYLE, P. E., BESSEY O. A., and Howe. P. R. Rate of Dentin Formation in Incisor Teeth of Guinea Pigs on Normal and on Ascorbic Acid-Deficient Diets. **Arch. Pathol.**, v. 30, p. 90–107, 1940. Disponível em: <https://www.cabidigitallibrary.org/doi/full/10.5555/19412201312>. Acesso em: 31 mar. 2026.
- BRASIL, Ministério da Saúde. **Portaria SAS/MS nº 710, de 27 de junho de 2013**. Aprova o Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas da Artrite Reumatoide. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2013. Disponível em: <https://www.saude.gov.br/images/pdf/2014/dezembro/15/Artrite-Reumatoide.pdf>. Acesso em: 31 mar. 2026.
- CARVALHO, A. S. *et al.* Avaliação da variação da temperatura intrapulpar após o uso de agentes clareadores e ativação por fontes de luz. **RSBO**, v. 6, n. 2, p. 163–68, 2009. Disponível em: <https://periodicos.univille.br/RSBO/article/view/1211>. Acesso em: 31 mar. 2026.
- CINTRA, L. T. A. *et al.* The number of bleaching sessions influences pulp tissue damage in rat teeth. **Journal of Endodontics**, v. 39, n. 12, p. 1576–1580, dez. 2013. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24238450/>. Acesso em: 31 mar. 2026.
- CHEN, H. *et al.* Targeted delivery of methotrexate by modified yeast β -glucan nanoparticles for rheumatoid arthritis therapy. **Carbohydrate Polymers**, v. 284, p. 119183, 15 maio 2022. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S014486172200087X> Acesso em: 31 mar. 2026.
- CRONSTEIN, B. N.; AUNE, T. M. Methotrexate and its mechanisms of action in inflammatory arthritis. **Nature Reviews. Rheumatology**, v. 16, n. 3, p. 145–154, mar. 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32066940/>. Acesso em: 31 mar. 2026.
- CRONSTEIN, B. N. *et al.* Methotrexate inhibits neutrophil function by stimulating adenosine release from connective tissue cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 88, n. 6, p. 2441–2445, 15 mar. 1991. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC51248/>. Acesso em: 31 mar. 2026.

DIETRICH, L. *et al.* A meta-analysis of ozone effect on tooth bleaching. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 13177, 23 jun. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-021-92733-8>. Acesso em: 31 mar. 2026.

DE EUZEBIO E.; ARMARIO-HITA J. C.; DE MIQUEL V. A. Treatment of Psoriasis: Focus on Clinic-based Management with Infliximab. **American Journal Clinical Dermatology**, v. 15, p. 5-16, 2014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24777571/>. Acesso em: 31 mar. 2026.

GALLINARI, M. de O. *et al.* Pulp response of rats submitted to bleaching and the use of different anti-inflammatory drugs. **PLoS One**, v. 14, n. 1, p. e0210338, 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30620760/>. Acesso em: 31 mar. 2026.

GUTH R. C. *et al.* Clareamento dental de consultório em dentes vitais com Whiteness HP Blue 20% e Whiteness HP Maxx 35%: relato de caso clínico. **Rev Dent online**, v. 11, n. 23, p. 33-37, 2012.

HOFFMEISTER, R. T. Methotrexate therapy in rheumatoid arthritis: 15 years experience. **The American Journal of Medicine**, v. 75, n. 6A, p. 69–73, 30 dez. 1983. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6660241/>. Acesso em: 31 mar. 2026.

KIKUTA, J. *et al.* Notch signaling induces root resorption via RANKL and IL-6 from hPDL cells. **Journal of Dental Research**, v. 94, n. 1, p. 140–147, jan. 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25376720/>. Acesso em: 31 mar. 2026.

KORNMAN, K. S. *et al.* The interleukin-1 genotype as a severity factor in adult periodontal disease. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 24, n. 1, p. 72–77, jan. 1997. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9049801/>. Acesso em: 31 mar. 2026.

KRAUSE, D. *et al.* The positive influence of methotrexate on the mortality of patients with rheumatoid arthritis is partly independent of its effect on disease activity: results of a re-evaluation 18 years after baseline. **Clinical and Experimental Rheumatology**, v. 32, n. 3, p. 395–400, 2014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24773941/>. Acesso em: 31 mar. 2026.

MATIS, B. A. *et al.* White diet: is it necessary during tooth whitening? **Operative Dentistry**, v. 40, n. 3, p. 235–240, 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25748208/>. Acesso em: 31 mar. 2026.

MOLLICA, F. B. *et al.* Temperature variation in pulp chamber during dental bleaching in presence or absence of light activation. **Revista Odonto Ciência (Online)**, v. 25, n. 4, p. 382–385, dez. 2010. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/roc/a/nV6XYjJPMMLbTSG6FKTfdXh/?format=html&lang=en>. Acesso em: 31 mar. 2026.

NAKANO, Y. *et al.* Expressions of RANKL/RANK and M-CSF/c-fms in root resorption lacunae in rat molar by heavy orthodontic force. **European Journal of Orthodontics**, v. 33, n. 4, p. 335–343, ago. 2011. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20833686/>. Acesso em: 31 mar. 2026.

PEREIRA, I. A. *et al.* Recomendações nacionais baseadas em evidências científicas e opiniões dos especialistas sobre o uso do metotrexato nas doenças reumáticas, especialmente na artrite reumatoide: resultados da iniciativa 3E do Brasil. **Rev. Bras. Reumatol.**, São Paulo, v. 49, n.4, p. 346-361, Aug. 2009. Disponível em:

<https://lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/62541/000765215.pdf?sequence=1>. Acesso em: 31 mar. 2026.

PINTO, M. R. *et al.* Role of induced nitric oxide synthases in orofacial nociception/discomfort after dental tooth bleaching with hydrogen peroxide. **Archives of Oral Biology**, v. 161, p. 105937, 1 maio 2024. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S000399692400058X>. Acesso em: 31 mar. 2026.

SILVA L. M. A. V. *et al.* Influence of pain -relieving therapies on inflammation and the expression of proinflammatory neuropeptides after dental bleaching treatment. **Restorative Dentistry & Endodontics**, v. 45, n. 2, p. e2 0, 2020. Disponível em:

<https://doi.org/10.5395/rde.2020.45.e20>. Acesso em: 31 mar. 2026.

SATO, C. *et al.* Tooth Bleaching Increases Dentinal Protease Activity. **Journal of Dental Research**, v. 92, n. 2, p. 187–192, 14 dez. 2012. Disponível em:


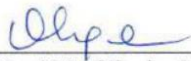
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23242228/>. Acesso em: 31 mar. 2026.

SHKLAR, G.: The Effect of 4-Amino-N⁵-Methyl-Pterolyglutamic Acid on Oral Mucosa of Experimental Animals. **J. Oral Ther. Pharmacol**, v. 4, p. 374-377, 1968. Disponível em:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15402273/>. Acesso em: 31 mar. 2026.

SUAREZ, C. R. *et al.* Effect of low dose methotrexate on neutrophil chemotaxis induced by leukotriene B4 and complement C5a. **J Rheumatol.**, v. 14, n. 1, p. 9-11, 1987. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3033240/>. Acesso em: 31 mar. 2026.

ANEXO A – CEUA

 <p>Unichristus Centro Universitário Christus</p>				
<p>CEUA INSTITUTO PARA DESENVOLVIMENTO DA EDUCAÇÃO LTDA IPADE CENTRO UNIVERSITÁRIO CHRISTUS</p>				
Of. No. 028/24				
Protocolo da CEUA: 028/24				
Pesquisador Responsável: SUELY BEZERRA DOS SANTOS				
Título do Projeto: INFLUÊNCIA DO METOTREXATO NO PROCESSO INFLAMATÓRIO DA POLPA DENTÁRIA DE RATOS SUBMETIDOS AO CLAREAMENTO 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 30 (trinta) de agosto de 2024.				
Descrição do animal utilizado:				
Espécie:	<table border="1"> <tr> <td>Ratas fêmeas</td> <td>Número Amostral:</td> <td>90</td> </tr> </table>	Ratas fêmeas	Número Amostral:	90
Ratas fêmeas	Número Amostral:	90		
Relatórios parciais e finais devem ser apresentados ao CEUA/Instituto para Desenvolvimento da Educação LTDA - IPADE ao término do estudo, período máximo 30/08/2025.				
Fortaleza, 30 de agosto de 2024.				
				
<p>Olga Vale Oliveira Machado Coordenadora CEUA/Instituto para Desenvolvimento da Educação LTDA - IPADE</p>				
<p>Campus Aldeota R. Visc. de Mauá, 1940 - Meireles Fortaleza - CE, 60125-058</p>	<p>Campus Benfica Rua Princesa Isabel, 1920 - Farias Brito Fortaleza - CE, 60015-060</p>	<p>Campus Dom Luís Av. Dom Luís, 911 - Aldeota Fortaleza - CE, 60160-230</p>	<p>Campus Parque Ecológico R. João Adolfo Gurgel, 133 - Cocó Fortaleza - CE, 60190-180</p>	<p>Campus Parquelândia Rua 21 de Abril, 259 - Bela Vista Fortaleza - CE, 60766-585</p>