

ALETÉIA MASSULA DE MELO FERNANDES

**CITOTOXICIDADE DE AGENTES CLAREADORES PARA
DENTES TRATADOS ENDODONTICAMENTE SOBRE
FIBROBLASTOS GENGIVAIS**



2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

ALETÉIA MASSULA DE MELO FERNANDES

**CITOTOXICIDADE DE AGENTES CLAREADORES PARA DENTES
TRATADOS ENDODONTICAMENTE SOBRE FIBROBLASTOS
GENGIVAIS.**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE, pelo Programa de Pós-Graduação em ODONTOLOGIA RESTAURADORA, Especialidade em Endodontia.

Orientadora: Profa. Adj. Márcia Carneiro Valera

São José dos Campos,
2009

Apresentação gráfica e normalização de acordo com:
Alvarez S, Coelho DCAG, Couto RAO, Durante APM. Guia prático para
Normalização de Trabalhos Acadêmicos da FOSJC. São José dos Campos:
FOSJC/UNESP; 2008.

F391c Fernandes, Aletéia Massula de Melo.
Citotoxicidade de agentes clareadores para dentes tratados
endodonticamente sobre fibroblastos gengivais / Aletéia Massula de Melo
Fernandes. __ São José dos Campos : [s.n.], 2009.
80f. : il.

Dissertação (Mestrado em Odontologia Restauradora) – Faculdade de
Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista, 2009.
Orientador: Profa. Dra. Márcia Carneiro Valera.

1. Agentes clareadores. 2. Cultura de células. 3. Citotoxicidade. 4.
Fibroblastos gengivais I. Valera, Márcia Carneiro II. Universidade Estadual
Paulista. Faculdade de Odontologia de São José dos Campos. III. Título.

tD15

Ficha catalográfica elaborada pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação da
Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP

AUTORIZAÇÃO

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por
qualquer meio convencional ou eletrônico, desde que citada a fonte.

São José dos Campos, 17 Agosto de 2009.

Assinatura :

E-mail: teia_odonto48@hotmail.com

BANCA EXAMINADORA

Profa. Adjunto Márcia Carneiro Valera (Orientadora)

Faculdade de Odontologia de São José dos Campos
Universidade Estadual Paulista - UNESP

Prof. Adjunto Idomeo Bonetti Filho

Faculdade de Odontologia de Araraquara
Universidade Estadual Paulista - UNESP

Prof. Adjunto Carlos Henrique Ribeiro Camargo

Faculdade de Odontologia de São José dos Campos
Universidade Estadual Paulista - UNESP

São José dos Campos, 17 de agosto de 2009

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha querida avó Maria, de quem sinto saudades
todos os dias.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por me dar força e iluminar o meu caminho. Obrigada por estar sempre comigo.

Aos meus pais:

Pai, Mãe e Denis,

Agradecer tudo o que vocês fizeram por mim é pouco. Obrigada por me proporcionarem uma boa educação e a chance de poder entrar em um curso de pós-graduação. Sem o apoio e incentivo de vocês esse sonho não seria possível. Amo vocês.

Aos meus irmãos:

Daniel e Pedro, vocês são os amores da minha vida, minha perspectiva de futuro, minha fonte de inspiração. Obrigada por existirem.

Ao meu avô Vanderlan:

Obrigada por acreditar e ter tanto orgulho de mim. Sei que você se sente realizado por me ver no mundo acadêmico. Não esqueça que você foi parte fundamental para que isso acontecesse. Obrigada, te amo.

Ao meu noivo Rafael:

Aos poucos você foi ganhando espaço e importância na minha vida. Obrigada por me amar, me entender e cuidar de mim. Você é muito especial, te amo.

Aos meus queridos amigos: Laura, Daniela, Jaqueline, Tathiana, Michele, Kamila, Raphael, Gustavo, Gabriel, Flávia, Henrique, Túlio, Luciana, Melini, Graziella, Fernanda Costa, Fernanda Oliveira, Wivian e Camila. Obrigada por fazerem parte da minha vida. Sem vocês tudo seria mais difícil. Amo vocês.

À minha tia Alcione e aos meus primos Leonardo e Letícia por estarem sempre presentes torcendo por mim. Amo vocês.

A toda minha família:

Obrigada pelo apoio e incentivo sempre. Amo vocês.

À minha orientadora:

Professora Márcia, obrigada pela oportunidade de trabalhar com a senhora. O mestrado despertou em mim uma paixão pelo mundo da pesquisa e pela carreira acadêmica e isso não teria acontecido se eu não tivesse alguém em quem me espelhar; sem dúvida nenhuma essa pessoa

foi você. Espero ter uma carreira tão brilhante quanto a sua. Obrigada por ter sido minha orientadora e amiga. Te respeito e te admiro muito.

Ique e Samira,

Obrigada pelo carinho e dedicação. Sou muito grata por todas as horas que vocês dedicaram a mim, ao laboratório e a esse trabalho. Tenho muita sorte de poder contar com pessoas tão competentes, prestativas, especiais e amigas. Vocês foram parte fundamental para a realização desse trabalho. Obrigada por tudo.

À professora Ana Paula,

Mesmo não sendo minha orientadora a senhora me ensinou muito sobre endodontia e sobre a vida. Afinidade não se explica, simplesmente acontece, com a senhora foi assim. Obrigada pelo carinho, atenção e amizade.

Ao professor Lafayette,

Obrigada pro todo apoio e carinho. Você é um exemplo de profissional e um amigo muito querido.

Aos meus amigos do Mestrado:

Marcos e Lorraine, tive muita sorte de conhecer e conviver com pessoas tão especiais como vocês. Compartilhamos momentos de alegria, angústia e muitas vezes de desespero; mas enfim, deu tudo certo. Tenho certeza que vocês terão um futuro brilhante. Obrigada por serem meus amigos e por toda a ajuda sempre. Vocês moram no meu coração

Às meninas do Doutorado:

Lilian e Alessandra, foi muito bom conhecer e conviver com vocês. Obrigada pelo apoio, ajuda e pelos momentos de descontração. Vocês são muito especiais.

Paula, você se tornou uma grande companheira e amiga. Obrigada por toda a ajuda durante a execução desse trabalho, principalmente na parte estatística. Obrigada pela companhia durante nossas viagens a São Paulo e durante todas as horas em que passamos no laboratório. Você é muito querida.

À professora Nadir, responsável pela disciplina de Bioquímica, obrigada pela ajuda e dedicação na realização deste trabalho.

Aos professores Claudio e Alberto, obrigada por me ensinarem Endodontia e por estarem sempre dispostos a me ajudar.

Aos professores e funcionários do Departamento de Odontologia Restauradora da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, obrigada pelo apoio e carinho.

À CAPES, pelo apoio à pesquisa e concessão de bolsa de estudo.

Agradeço à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, em especial à Professora Márcia Marques por me ensinar a trabalhar com cultura de células e pelas células cedidas para a realização deste trabalho. Às alunas Carol Dantas e Carol Vivian, obrigada pela atenção, dedicação e por todo o tempo em que vocês me acompanharam durante a realização do piloto deste trabalho.

Obrigada a todos que de alguma forma colaboraram na realização deste trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO	11
LISTA DE FIGURAS	12
LISTA DE QUADROS E TABELAS	13
1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DA LITERATURA	19
3 PROPOSIÇÃO	29
4 MATERIAL E MÉTODO	30
4.1 Cultivo das células	30
4.1.1 Descongelamento.....	31
4.1.2 Troca de meio.....	32
4.1.3 Subcultura.....	33
4.1.4 Contagem de células.....	34
4.2 Plaqueamento	36
4.3 Levantamento da curva padrão de crescimento e viabilidade celular	36
4.4 Divisão dos grupos experimentais	36
4.5 Condicionamento do meio de cultivo	38
4.6 Avaliação da viabilidade e crescimento celular	39
4.7 Mensuração da quantidade de peróxido de hidrogênio liberado no meio	40
4.7.1 Padronização do peróxido de hidrogênio.....	41
4.7.1.1 Preparo das soluções.....	41
4.7.1.2 Titulação.....	43
4.7.2 Levantamento da curva padrão.....	45
4.7.2.1 Preparo das soluções.....	45
4.7.2.2 Leitura em espectrofotômetro.....	48

4.7.3 Mensuração em espectrofotômetro do peróxido de hidrogênio liberado nas condições experimentais.....	50
4.8 Análise estatística.....	51
5 RESULTADOS.....	52
5.1 Avaliação da viabilidade celular.....	52
5.2 Quantificação do peróxido de hidrogênio.....	55
5.3 Análise estatística.....	56
5.3.1 Estatística Descritiva.....	56
5.3.1.1 Estatística descritiva para viabilidade celular.....	56
5.3.2 Teste de Anova.....	59
5.3.3 Teste de Tukey.....	60
6 DISCUSSÃO.....	62
7 CONCLUSÃO.....	70
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	71
ANEXOS.....	79
ABSTRACT.....	80

Fernandes AMM. Citotoxicidade de agentes clareadores para dentes tratados endodonticamente sobre fibroblastos gengivais [dissertação]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista; 2009.

RESUMO

A proposta deste trabalho foi avaliar a citotoxicidade do peróxido de hidrogênio liberado por agentes clareadores, utilizados para clareamento de dentes tratados endodonticamente, sobre cultura de fibroblastos provenientes do tecido gengival humano (FMM1). As células foram cultivadas em DMEM e quando apresentaram-se em quantidade suficiente e entre a quinta e décima passagens foram plaqueadas em placas de 96 poços onde receberam os meios de cultura condicionados de acordo com os grupos experimentais (n=12): G1- Perborato de Sódio + água; G2- Perborato de sódio + Peróxido de Carbamida 20%; G3- Peróxido de Carbamida 20%; G4- Perborato de Sódio + Peróxido de Hidrogênio 35%; G5- Peróxido de Hidrogênio 35%. O grupo controle (n=12) correspondeu à curva de crescimento e viabilidade celular, onde as células não receberam tratamento. O ensaio com MTT foi realizado nos períodos de 24 e 48 horas para avaliar a viabilidade celular. Paralelamente, mediu-se em espectrofotômetro a quantidade de peróxido de hidrogênio liberado nas condições experimentais. Os dados foram analisados através dos testes de ANOVA e Tukey. Todos os grupos experimentais apresentaram diferença significativa em relação ao controle. O tempo de avaliação mostrou diferença estatística, exceto para o G1 (PS + H₂O). Concluiu-se que: todos os agentes clareadores testados foram citotóxicos, diminuindo significativamente o metabolismo e viabilidade celular; a associação do perborato de sódio com água destilada foi o agente clareador mais tóxico e o peróxido de carbamida 20% o menos tóxico.

Palavras-Chave: Agentes Clareadores. Cultura de células. Citotoxicidade. Fibroblastos gengivais.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	a) remoção do puxador com as caixas do tambor de nitrogênio; b) caixa de acondicionamento de tubos criogênicos; c) criogênico contendo as células FMM1	32
Figura 2 -	a) meio de cultura (DMEM), PBS e tripsina; b) frascos utilizados para realização de subcultura de células.....	34
Figura 3 -	Realização da contagem celular: a) e b) 10 µl de meio com c sendo na câmara de Neubauer; c) câmara de Neubauer para contagem celular.....	35
Figura 4 -	Agentes clareadores: a) Perborato de Sódio; b) Peróxido de Carbamida 20%; c) Peróxido de Hidrogênio 35%.....	38
Figura 5 -	Ensaio com MTT: a) leitora de microplacas (espectrofotômetro); b) DMSO e MTT.....	40
Figura 6 -	Representação gráfica dos valores de absorbância para as diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio.....	49
Figura 7 -	Gráfico de barras ilustrando a quantidade de peróxido liberada em cada uma das condições experimentais.....	56
Figura 8 -	Representação gráfica dos resultados para cada uma das condições experimentais.....	57
Figura 9 -	Gráfico das médias da porcentagem da viabilidade celular dos grupos experimentais em relação ao grupo controle.....	59

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1 - Divisão dos grupos experimentais.....	37
Quadro 2 - Volume de Tiosulfato de Sódio 0,1 N gastos na titulação da amostra de peróxido de hidrogênio.....	43
Quadro 3 - Volumes de tiosulfato de sódio 0,1N gastos na titulação do Branco.....	44
Quadro 4 - Diluições realizadas para obtenção de amostras contendo de 0,5 a 2,5 µg de peróxido de hidrogênio.....	47
Tabela 1 - Porcentagem de viabilidade celular para o grupo 1 (PS+H ₂ O).....	52
Tabela 2 - Porcentagem de viabilidade celular para o grupo 2 (PS+PC20%).....	53
Tabela 3 - Porcentagem da viabilidade celular para o grupo 3 (PC20%).....	53
Tabela 4 - Porcentagem da viabilidade celular para o grupo 4 (PS+PH35%).....	54
Tabela 5 - Porcentagem da viabilidade celular para o grupo 5 (PH35%).....	54
Tabela 6 - Quantidade de peróxido de hidrogênio (µg) liberada na simulação das condições experimentais.....	55
Tabela 7 - Estatística descritiva dos valores de porcentagem da viabilidade celular obtido na avaliação após 24 horas.....	57
Tabela 8 - Estatística descritiva dos valores de porcentagem da viabilidade celular obtido na avaliação após 48 horas.....	58
Tabela 9 - Valores referentes à atividade do metabolismo celular nos diferentes tempos de avaliação.....	58

Tabela 10 - Teste ANOVA para viabilidade celular dos grupos experimentais em relação ao grupo controle.....	60
Tabela 11 - Teste ANOVA para agentes clareadores em relação ao tempo.....	60
Tabela 12 - Teste de Tukey para a variável agente clareador no tempo 24 h.....	61
Tabela 13 - Teste de Tukey para a variável agente clareador no tempo 48 h tempo 48 h.....	61
Tabela 14 - Teste de Tukey para a variável agente clareador.....	61

1 INTRODUÇÃO

No mundo moderno, dentes brancos, bem contornados e alinhados estabelecem o padrão de beleza, ao qual a estética facial e o sorriso estão intimamente relacionados. Para isto, o clareamento dental torna-se um artifício bastante utilizado, já que permite a correção das alterações de cor dos dentes aliado a um baixo custo deste procedimento (Dostalova et al., 2004).

As indicações para se utilizar o procedimento de clareamento dental estão associadas à existência de alterações cromáticas na estrutura dentária. Estudos mostram que a técnica de clareamento é eficaz no tratamento de fluorose, manchamento por tetraciclina, pigmentação intrínseca ou extrínseca adquiridas durante o envelhecimento ou ainda em escurecimentos decorrentes da terapia endodôntica (Goldstein; Garber, 1995; Matis et al., 2000). Além disso o clareamento dental permite a preservação da estrutura dental original, dispensando intervenções restauradoras invasivas para correção das alterações de cor (Leonardo, 2005).

O manchamento de dentes tratados endodonticamente pode ser devido a hemorragia interna após um traumatismo dentário, degradação do tecido pulpar e células sanguíneas, limpeza deficiente da câmara pulpar durante o tratamento endodôntico e uma má escolha de cimentos e materiais para obturar o canal e/ou restaurar a abertura do acesso endodôntico (Abbott, 1997).

Os materiais clareadores mais utilizados atualmente para clarear dentes endodonticamente tratados são: peróxido de hidrogênio, peróxido de carbamida e perborato de sódio associado à água destilada, solução salina fisiológica, peróxido de hidrogênio ou ao peróxido de

carbamida (Palo, 2005). Os agentes clareadores possuem mecanismos de ação semelhantes, pois tanto o peróxido de carbamida como o perborato de sódio degrada-se em peróxido de hidrogênio que por sua vez, se decompõe em água e radicais oxidativos. Portanto, o peróxido de hidrogênio é o agente ativo para o clareamento dental que possui baixo peso molecular e capacidade para desnaturar proteínas (Haywood; Heymann, 1989).

O mecanismo de ação dos agentes clareadores envolve uma reação de oxidação dos componentes orgânicos na qual a substância a ser clareada doa elétrons ao agente clareador, resultando no processo em que os compostos com anéis de carbono pigmentados são abertos e convertidos em cadeias intermediárias mais claras, levando ao clareamento dental (Goldstein; Kiremidjian-Schumacher, 1993). Esta reação é possível devido ao baixo peso molecular dos produtos a base de peróxido de hidrogênio, permitindo sua difusão através da dentina, esmalte e cimento (Haywood; Heymann, 1989; Haywood; Heymann, 1991).

A permeabilidade dentinária e a integridade do cimento possuem papel determinante na penetração de agentes clareadores para a superfície radicular externa durante o processo de clareamento interno. Nos estudos de Palo (2005), verificou-se que ocorreu a penetração de peróxido da câmara pulpar para a superfície dentinária externa em todos os grupos experimentais, mostrando através da microscopia eletrônica de varredura que os espécimes não apresentavam fendas ou falhas na junção amelo-cementária. Entretanto, sabe-se que essa junção pode apresentar fendas, expondo a dentina ao tecido periodontal nessa região. De acordo com Neuvald e Consolaro em 2000, em cerca de 10% dos casos, pode ocorrer esta exposição. Nesses casos, os íons provenientes da ação dos agentes clareadores podem alcançar os tecidos vivos com maior facilidade e então causar um processo inflamatório.

A importância da penetração do peróxido através das estruturas dentárias até o periodonto se deve ao fato de que ao entrar em contato com os tecidos, o peróxido de hidrogênio assim como outros radicais causam destruição celular e tecidual (Halliwell; Gutteridge, 1984; Ramp et al., 1987) além de sérios danos aos fibroblastos humanos (Simon et al., 1981). Além disso, a reabsorção radicular externa há muito tempo vem sendo observada como consequência do clareamento dental interno. Uma das hipóteses levantadas é que o agente clareador poderia iniciar um processo reabsortivo inflamatório no ligamento periodontal através de sua difusão pelos túbulos dentinários durante o procedimento clareador. Outra hipótese seria de que o processo reabsortivo poderia estar relacionado com o calor empregado na técnica clareadora ou mesmo relacionado a um trauma sofrido pelo paciente anteriormente ao clareamento (Harrington; Natkin, 1979).

De acordo com Laroui et al. (2004), o peróxido de hidrogênio é capaz de interagir diretamente com o DNA, causando danos oxidativos ao mesmo. Sabe-se que danos oxidativos ao DNA vêm sendo reconhecidos como causa principal de morte celular e mutações em organismos aeróbios; em humanos é considerado um importante agente promotor de câncer (Slupphaug et al., 2003).

Através de testes de genotoxicidade, Ribeiro et al. (2005), avaliaram que diversos agentes clareadores a base de peróxido de hidrogênio causaram danos ao DNA de células de linfoma de ratos; sendo que quanto maior a concentração do agente clareador, maior é o dano causado.

Os fibroblastos são as células predominantes do tecido periodontal (região mais afetada quando da realização do clareamento em dentes tratados endodonticamente), sendo responsáveis pela manutenção da integridade e saúde desse tecido. Essas células sintetizam colágeno dos tipos I, III e V além de fibronectina (Tipton et al., 1995).

Sendo assim, estudos que avaliam a biocompatibilidade dos agentes clareadores são necessários a fim de indicar procedimentos clareadores com maior segurança. O teste de citotoxicidade vem sendo uma alternativa viável e comumente utilizada para avaliação dos efeitos biológicos de materiais, fornecendo resultados rápidos e precisos (Azevedo et al., 2003; Cavalcanti et al., 2005).

A cultura de células é um método que possibilita o controle do meio (pH, temperatura, pressão osmótica, tensão de O₂ e CO₂), controle das condições fisiológicas, e grupos com características homogêneas. Assim, os resultados obtidos apresentam alta reprodutibilidade e credibilidade, uma vez que as variáveis são extremamente minimizadas. Outras vantagens são: a menor necessidade de reagente, possibilidade de precisar a concentração do produto a ser testado e o tempo efetivamente aplicado sobre as células, além da redução do uso de animais para testes (Freshney, 2000).

Uma vez que os agentes clareadores podem provocar danos celulares e teciduais e que a cultura celular pode fornecer dados significantes quanto à citotoxicidade destes produtos, este estudo será realizado para avaliar as possíveis alterações no metabolismo celular após utilizar de diferentes produtos para clareamento de dentes tratados endodonticamente.

2 REVISÃO DA LITERATURA

A estética constitui importante papel na odontologia moderna. A beleza dos dentes é influenciada pelo contorno, forma, simetria e coloração. Sabe-se que o manchamento de dentes que não apresentam vitalidade pulpar ocorre na maior parte dos casos em decorrência do próprio processo de necrose pulpar; quando produtos sanguíneos, bactérias e diversas proteínas penetram no interior dos túbulos dentinários. No processo de hemólise são produzidos muitos componentes minerais de coloração marrom escuro ou preta (Howell, 1980). O uso de materiais contendo prata precipitada ou iodofórmio, abertura coronária incorreta e permanência de materiais obturadores na câmara pulpar podem também causar o escurecimento da estrutura dentária (Dezotti et al., 2002). Howell em 1980 acrescenta em seu estudo que uma grande porcentagem de dentes escurecidos apresenta história de injúria traumática.

Goldstein et al.,1989 ressaltaram que há mais de um século o clareamento vem sendo utilizado, apresentando grande eficácia no tratamento de manchamentos dentinários. Para esses autores, este procedimento é o tratamento de escolha para dentes escurecidos, embora possa ser utilizado em associação a restaurações adesivas, facetas laminadas de porcelana ou tratamentos protéticos.

O clareamento de um dente sem vitalidade pulpar foi descrito primeiramente em 1864 (Truman, 1864) e uma série de substâncias como: cloro, hipoclorito de sódio, perborato de sódio e peróxido de hidrogênio foram utilizadas sozinhas ou em combinações, com ou sem ativação por calor, para realização desse procedimento (Howell, 1980).

Segundo os estudos de Dahl e Pallesen em 2003, a técnica “walking bleaching” para clareamento de dentes tratados endodonticamente foi introduzida por Spasser em 1961 que utilizou a mistura de água e perborato de sódio no interior da câmara pulpar, que permanecia selada entre uma consulta e outra do paciente ao cirurgião dentista. Posteriormente a água foi substituída por peróxido de hidrogênio 30%, potencializando a eficácia desse procedimento.

Além da ampla utilização do peróxido de hidrogênio e peróxido de carbamida, em 1993, Baratieri et al. relataram o uso do perborato de sódio associado à água destilada, soro fisiológico ou ainda ao peróxido de hidrogênio 30% como agente clareador, para o tratamento de dentes tratados endodonticamente.

Em relação ao processo de clareamento, Hirata et al. (1997) explicam que o peróxido de hidrogênio atua como um forte agente oxidante através da formação de radicais oxidativos, que promovem a oxidação das manchas. As macromoléculas das manchas dentárias após a oxidação, se quebram em estruturas menores e se difundem em direção à superfície, o que proporciona o clareamento dental. Por isso, o peróxido de hidrogênio é o agente ativo de escolha para realização deste procedimento, sendo utilizado diretamente ou a partir de reações químicas derivadas do perborato de sódio ou do peróxido de carbamida (Dahl; Pallesen, 2003).

Leonardo em 2005 acrescenta que o peróxido de hidrogênio se decompõe em soluções aquosas para produzir radicais hidroxilas, os quais são altamente reativos e instáveis. Quando esses agentes reagem com moléculas orgânicas altamente conjugadas, eles rompem a conjugação do elétron e alteram a absorção de energia da molécula. Dessa maneira, moléculas maiores, altamente escuras e de cadeias longas reagem com os radicais livres ocorrendo nelas uma alteração que as tornam menores e com cadeias mais curtas, levando à alteração na sua estrutura óptica.

Com o avanço e aplicabilidade do clareamento interno, foram surgindo críticas sobre os efeitos deletérios que o mesmo poderia causar nos tecidos bucais. Esses efeitos podem ser devido ao baixo peso molecular dos agentes clareadores, permitindo a difusão destes pela estrutura dentária, podendo alcançar os tecidos pulpare e periodontais (Benetti et al., 2004; Gokay et al., 2008).

Apesar de serem os tecidos mais duros do corpo humano, esmalte dentina são permeáveis ao peróxido de hidrogênio, que é capaz de atravessá-los e atingir o tecido pulpar (Benetti et al., 2004; Camargo et al., 2007). Em concordância com esses autores, em 1993, utilizando-se de um dispositivo chamado câmara pulpar in vitro, Hanks et al. avaliaram a permeabilidade de discos de dentina de 0,5 mm ao peróxido de carbamida a 10 e 15% e ao peróxido de hidrogênio a 2 e 10%, aplicando o agente clareador sobre a dentina por uma ou seis horas. Os autores concluíram que a quantidade de peróxido de hidrogênio que atravessa a dentina é proporcional à concentração original do agente clareador e ao tempo de aplicação.

Em 1989 Fuss et al. avaliaram a permeabilidade dos túbulos dentinários pela ação do hidróxido de cálcio e de diferentes agentes clareadores. Trinta dentes humanos foram divididos em três grupos de acordo com o preenchimento de seus canais radiculares: Grupo I: canal preenchido com a mistura de peróxido de hidrogênio 30% e perborato de sódio; Grupo II: canal preenchido com uma pasta de hidróxido de cálcio e água destilada e Grupo III: bolinha de algodão no interior do canal radicular. Todos os dentes tiveram a superfície radicular externa selada com parafina, com exceção de seu terço coronário e imersas em água destilada com pH=7. Através de uma metodologia adotada a fim de mensurar mudanças no valor do pH, os autores concluíram que os agentes clareadores possuem a capacidade de atravessar as paredes dentinárias, alcançando a superfície externa, nas áreas sem cimento.

Assim como Rotstein em 1991, através de um modelo *in vitro*, observou a penetração de peróxido de hidrogênio 30% para a superfície dentinária externa. Foram analisados 20 pré-molares humanos, em que foram realizados pequenos defeitos no cimento que recobria a junção esmalte-cimento. Após tratamento endodôntico os dentes receberam aplicação do agente clareador e termoativação por 15 ciclos de 1 minuto. Os resultados mostraram que em todos os espécimes o peróxido de hidrogênio foi capaz de alcançar a superfície externa das raízes.

Nesse mesmo ano, Rotstein et al., reportaram os efeitos dos defeitos cementários na penetração de peróxido de hidrogênio 30% durante o clareamento interno. Trinta e seis premolares humanos foram utilizados no experimento, sendo seis utilizados como controle. Após o tratamento endodôntico esses dentes foram divididos em 3 grupos: GA: dentes sem defeitos, GB: dentes com defeitos no nível da junção amelo-cementária e GC: dentes com defeitos 4 mm da junção amelo-cementária. Em todos os grupos foi realizado o clareamento interno utilizando-se a técnica termocatalítica. Através dos resultados obtidos com o emprego da metodologia utilizada para quantificar a passagem de H_2O_2 para a superfície externa, baseada na espectrofotometria, os autores concluíram que: a quantidade de H_2O_2 coletado no meio externo dos dentes que não apresentavam defeitos cementários foi significativamente menor do que nos grupos em que estes estavam presentes.

A colocação de uma base protetora de 2 mm com materiais restauradores temporários na entrada do canal radicular, como foi preconizada por Nutting e Poe (1963), foi sendo então recomendada como artifício para evitar a penetração do agente clareador para os túbulos dentinários, tecidos periodontais e região periapical.

Em 1994 Weiger et al. avaliaram a penetração radicular do peróxido de hidrogênio associado a várias formas de perborato de sódio durante o clareamento interno. Utilizaram-se 63 dentes humanos

em que foi realizado tratamento endodôntico com uso de uma base protetora de IRM na entrada do canal. Foram criados defeitos no cimento no nível da junção amelo-cementária, após os dentes terem sido corados artificialmente. Os dentes foram divididos em seis grupos, de acordo com o agente clareador utilizado: G1: perborato de sódio monohidratado + H₂O₂ 30% (n=12), G2: perborato de sódio trihidratado + H₂O₂ 30% (n=12), G3: perborato de sódio tetrahidratado + H₂O₂ 30% (n=12), G4: perborato de sódio tetrahidratado + H₂O (n=12), G5: perborato de sódio tetrahidratado + H₂O + gel experimental (n=12), G6: sem pasta clareadora (n=3). Através da técnica “walking bleaching” todos os dentes foram clareados durante um período de seis dias, com trocas do agente clareador no primeiro e terceiro dia. Os autores concluíram que o agente clareador de quase todos os dentes dos grupos experimentais conseguiram penetrar na dentina radicular. A penetração de peróxido de hidrogênio foi significativamente maior nos grupos 1 e 3 em relação aos grupos 4 e 5.

Dezotti et al., em 2002, propuseram estudar uma possível via de comunicação entre a câmara pulpar e a superfície radicular externa, medindo o pH e a infiltração de corante na dentina cervical após o clareamento. Trinta e quatro dentes humanos receberam tratamento endodôntico e foram divididos em 3 grupos experimentais de acordo com o corte da obturação radicular e uso de selamento: G1: Corte da obturação 2 mm abaixo da junção amelo-cementária vestibular (n=9), G2: Corte da obturação ao nível da junção amelo-cementária radicular (n=9), G3: da obturação 2 mm abaixo da junção amelo-cementária vestibular (n=8), sendo esses dentes selados com cimento ionômero de vidro, G4: grupo controle, sem agente clareador (n=8). O clareamento foi realizado utilizando-se perborato de sódio e peróxido de hidrogênio 30%. Os dentes foram imersos em água destilada com pH=5,6. As leituras em um pHmetro foram realizadas por um período de 30 minutos, 24 horas, 48 horas e 72 horas após colocação do agente clareador. Os agentes clareadores

foram removidos e os dentes lavados e secos, para então receberem bolinhas de algodão embebidas em fucsina e deixadas no interior da câmara pulpar por 24 horas. Os dentes foram então cortados no sentido vestibulo-lingual. Os resultados mostraram que o material clareador passa pela estrutura dentária após o procedimento clareador e a permeabilidade dentinária mostra-se aumentada.

Posteriormente, Oliveira et al., em 2003 avaliaram a eficácia da base cervical em evitar ou minimizar a infiltração de agentes clareadores nos túbulos dentinários. Foram utilizados trinta e oito dentes humanos que foram preparados, obturados e divididos em 3 grupos experimentais: G1: corte de guta-percha 3 mm abaixo na junção amelo-cementária vestibular com colocação de base cervical de cimento de ionômero de vidro modificado por resina, G2: corte de guta-percha 3 mm abaixo da junção amelo-cementária vestibular com colocação de base cervical de cimento ionômero de vidro, G3: corte de guta-percha no nível da junção amelo-cementária sem colocação de base cervical. Os dentes receberam material clareador (perborato de sódio + H₂O₂ 30%) em suas câmaras pulpares, permanecendo selados durante três dias; sendo este procedimento realizado três vezes. Após análise em estereomicroscópio de todos os espécimes, os autores concluíram que: o uso de base cervical diminui a infiltração de agente clareador em direção apical; porém, não impede a passagem do agente clareador nos túbulos dentinários, para as paredes dos canais em direção a superfície radicular externa.

A difusão de agentes clareadores sobre os tecidos dentinários explica dentre muitas coisas, o aparecimento de alterações nessas estruturas após o processo de clareamento.

Assim, Dahl e Becher em 1995, avaliaram a toxicidade do peróxido de carbamida em ratos. Dois agentes clareadores foram inoculados sistemicamente em ratos: peróxido de carbamida e uma preparação do gel Opalescence (Ultradent, South Jordan, UT, USA) que continha 10% de peróxido de carbamida e carbopol. Após o sacrifício dos

animais e análise no microscópio de luz, os resultados mostraram que os dois géis clareadores provocaram ulcerações na mucosa gástrica do estômago. Em alguns animais, áreas de necrose e presença de células imaturas em atividade mitótica foram encontradas no tecido glandular.

Robertson e Melfi (1980) investigaram histologicamente a resposta pulpar frente à aplicação de peróxido de hidrogênio 35% em dentes humanos jovens. Os resultados mostraram que nos grupos que receberam aplicação desse agente clareador houve resposta inflamatória leve, apresentando infiltrado inflamatório composto predominantemente por neutrófilos e linfócitos, acompanhado de destruição celular generalizada. Assim como Nathanson em 1997 afirmou que tanto o clareamento de consultório quanto o caseiro foram capazes de induzir desconforto pós-operatório em um número significativo de pacientes.

Já em 1979, Harrington e Natkin alertaram sobre o grande número de casos diagnosticados com reabsorção cervical externa após o clareamento interno de dentes sem vitalidade pulpar; ressaltando, porém a impossibilidade de se estabelecer certamente uma relação direta de causa-efeito entre a patologia e o clareamento.

Posteriormente, Cvek e Lindvall (1985) relataram casos de reabsorção radicular cervical após clareamento em dentes em que foi-se realizado tratamento endodôntico. Em seus estudos, encontraram nove tratamentos com reabsorção progressiva e cinco que resultaram em extração, totalizando treze casos.

Em um estudo *in vitro*, Kehoe em 1987, realizou leituras de pH na região da junção amelo-cementária, demonstrando uma leve acidez após aplicação do agente clareador. Este fato parece ser responsável pela reabsorção, uma vez que favorece a atividade osteoclástica nessa mesma região.

Em 1992, Rotstein et al., realizaram uma pesquisa a fim de avaliar os efeitos dos agentes clareadores nos componentes da dentina e do cimento humano. Para esses autores, o uso do peróxido de

hidrogênio está associado à reabsorção radicular externa, atribuindo este fato às alterações na estrutura original dos componentes orgânicos e inorgânicos do cimento e da dentina; seguido do aumento da solubilidade, tornando essas estruturas mais susceptíveis à reabsorção.

Uma alta dosagem de peróxido de hidrogênio pode causar queimaduras no tecido gengival (Dahl; Pelleesen 2003). Em 1995, Tipton et al., avaliaram a citotoxicidade do peróxido de hidrogênio em baixas concentrações sobre os fibroblastos gengivais. Nesse estudo através da microscopia, verificou-se que concentrações de 0,017% a 0,25% do agente clareador já eram capazes de causar alterações morfológicas nas células, enquanto que concentrações acima de 0,25% causaram morte celular.

Para avaliar o comportamento biológico de agentes clareadores, existem diversos métodos empregados no estudo de biocompatibilidade de materiais. Na odontologia, conforme estabelecido pela *Fédération Dentaire internationale*, para análise dos materiais, eles devem ser submetidos primeiramente aos testes iniciais, seguidos pelos testes secundários e finalizados pelos de aplicação clínica. O cultivo celular se destaca como opção dentre os testes iniciais, devendo sempre simular as condições de uso no tecido de destino.

Quando devidamente padronizados, os testes de citotoxicidade em cultura de células são facilmente reproduzidos, produzem resultados rápidos e bastante sensíveis, além de possibilitarem o controle da maior parte das variáveis. Estes testes são de custo relativamente baixo, e determinam de maneira preliminar o possível efeito citotóxico de um determinado material experimental ou de seus componentes isolados, determinando a necessidade de dar continuidade na avaliação nos demais níveis de pesquisa, podendo reduzir inclusive a necessidade de testes em animais (Costa, 2001). Por definição, citotoxicidade de um agente significa o efeito destrutivo que este agente provoca às células (Li, 1996).

Para Schmalz (1994), a toxicidade de um material odontológico pode ser avaliada por testes *in vitro*, experimentais em animais ou por estudos clínicos em humanos. Os testes *in vitro* são os mais utilizados para se avaliar a citotoxicidade ou genotoxicidade de um material utilizado na odontologia. Os testes de citotoxicidade podem ser realizados em cultura de órgãos, células ou em organelas celulares. Para os materiais odontológicos, a técnica em cultura de células é a mais indicada e utilizada; sendo que o contato entre as células e os materiais a serem testados, pode ocorrer de maneira direta ou indireta.

Kim et al. em 2007 estudaram a efetividade do teste MTT para verificação da viabilidade de células de ligamento periodontal. O MTT vem sendo utilizado para testes de citotoxicidade em cultura de células, avaliando o metabolismo mitocondrial das mesmas. Para esses autores este é um teste rápido, de alta eficácia, fácil manipulação e fornece imediatamente a quantidade e identificação de células viáveis. Da mesma forma, Eldeniz et al., 2007 concordam com a eficácia do MTT na avaliação do metabolismo celular após contato das células com diferentes produtos e consideram este teste simples, rápido e que garante resultados reais.

Assim, Koulaouzidou et al. em 1998 fizeram análise de diferentes diluições de dois agentes clareadores (um a base de peróxido de uréia e outro a base de peróxido de hidrogênio) sobre culturas de células de L929 (fibroblastos de pele de ratos) e BHK21/C13 (fibroblastos de rins de hamsters). Esses autores concluíram que os dois agentes clareadores apresentaram citotoxicidade sobre os fibroblastos, sendo o peróxido de hidrogênio o mais tóxico.

Em 2001, Kinomoto et al. compararam a citotoxicidade do perborato de sódio com a do peróxido de hidrogênio nas células do ligamento periodontal *in vitro*. Para este estudo utilizaram um ensaio baseado na liberação de desidrogenase láctea de células com a membrana citoplasmática danificada. Os resultados mostraram que o

perborato de sódio parece ser mais seguro que o peróxido de hidrogênio no período de 24 horas; e que a mistura de perborato de sódio com peróxido de hidrogênio foi a mais citotóxica em todos os períodos de avaliação.

Aren em 2003 avaliou os efeitos de agentes clareadores sobre cultura de células de carcinoma mamário de ratas. Foram testados dois agentes clareadores: Power Gel (Kreativ) e Opalescence PF (Ultradent) que permaneceram em contato com as células por 24 horas. Através da coloração de azul de tripan para exclusão de células mortas e da análise do crescimento e viabilidade celular em microscopia de luz invertida, o autor concluiu que: ambos géis clareadores mostraram-se citotóxicos para essas células. Utilizando-se de células dessa mesma espécie animal, Ribeiro et al. em 2005 avaliaram a citotoxicidade de agentes clareadores em células de linfoma de ratos (L5178Y) utilizando-se do teste de viabilidade celular e teste do cometa (utilizado para verificação de danos ao DNA celular). Os agentes clareadores a base de peróxido de hidrogênio a 35% (Whiteness HP e Lase peroxide) mostraram ser os mais lesivos às células; causando maiores danos ao DNA e menores porcentagens de células viáveis ao fim do experimento dos que os agentes clareadores a base de peróxido de hidrogênio a 16% (Clarigel Gold, Whitespeed, Nlte White Excel 2, Magic Bleaching).

Recentemente, Lima et al. (2009) avaliaram a citotoxicidade do gel de peróxido de carbamida 10% (Whiteness FGM), em diferentes diluições, sobre cultura de células de linhagem imortalizada MDPC-23. Os resultados mostraram que mesmo baixas concentrações do agente clareador foram capazes de produzir efeitos citotóxicos e que quando da utilização do peróxido de carbamida na diluição de 0,1%, ocorreu redução do metabolismo celular na faixa de 80%.

3 PROPOSIÇÃO

Propõe avaliar se agentes clareadores utilizados para dentes tratados endodonticamente são citotóxicos sobre fibroblastos provenientes do tecido gengival humano.

4 MATERIAL E MÉTODO

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP (Anexo 1).

4.1 Cultivo das células

Foram utilizados fibroblastos de linhagem primária estabelecida a partir de tecido gengival humano (FMM1- Laboratório de Cultura de Células - FOUSP). As células foram cultivadas em meio mínimo essencial de Dulbecco modificado por Eagle (DMEM), suplementado com soro fetal bovino a 10% e solução antibiótica-antimicótica a 1% (Cultilab Ltda, Campinas, Brasil) (Figura 2a). Em seguida, foram semeadas em frascos de cultivo (Prolab, São Paulo, Brasil) e após a subconfluência da camada de células, estas foram destacadas com auxílio de solução de tripsina 0,25% diluída em solução salina de tampão de fosfato (PBS) (Cultilab Ltda, Campinas, Brasil), a fim de reduzir a toxicidade da tripsina. Em seguida, essas células foram semeadas em novo frasco. Após as passagens necessárias de subcultura (6ª passagem), as células foram semeadas em placas com 96 poços (Prolab, São Paulo, Brasil), onde receberam posteriormente os meios de cultura condicionados. As etapas até a aplicação dos meios condicionados serão descritas a seguir.

4.1.1 Descongelamento

Todos os procedimentos foram realizados dentro da capela de fluxo laminar (Grupo Veco, Campinas, Brasil). Em um frasco grande para cultura de célula (garrafa 75 cm² – 270 ml), foram pipetados 10 ml de meio de cultura; esse procedimento foi realizado com antecedência, para que a tensão superficial do frasco e do meio fosse quebrada. Paralelamente, em um tubo de ensaio (Prolab, São Paulo, Brasil) de 15 ml foram colocados 10 ml de meio de cultura, que serviu para neutralizar o DMSO (dimetilsulfóxido) (Sigma Aldrich Co., Germany), substância na qual a célula é congelada e que em temperatura ambiente torna-se tóxica para as mesmas. No livro de registros do banco de células foram selecionados o puxador e a caixa do tambor de nitrogênio (Thermo Fisher Scientific Inc, United States) que continham as células desejadas (Figura 1a e 1b). Um tubo criogênico (Prolab, São Paulo, Brasil) (Figura 1c) foi removido e levado imediatamente para o banho-maria (Quimis, Aparelhos Científicos, Brasil) até o descongelamento do mesmo. O tubo foi levado rapidamente para capela de fluxo laminar e o seu conteúdo despejado no tubo de ensaio contendo meio de cultura. O tubo de ensaio foi então levado à centrifuga (Qumis Aparelhos Científicos, Brasil) por 5 minutos a 1000 rpm e ao ser retirado observou-se a formação de um precipitado de células, chamado de *pelet*. Na capela o meio de cultura sobrenadante foi aspirado e as células foram ressuspensas em 1 ml de meio fresco e então colocadas no frasco para cultura de células previamente preparado. O frasco foi levado ao microscópio de luz invertida (Qumis, Aparelhos Científicos, Brasil) para verificação da presença de células e posteriormente à estufa atmosférica a 37° C com tensão de CO₂ 5% (Thermo Fisher Scientific Inc, United States).

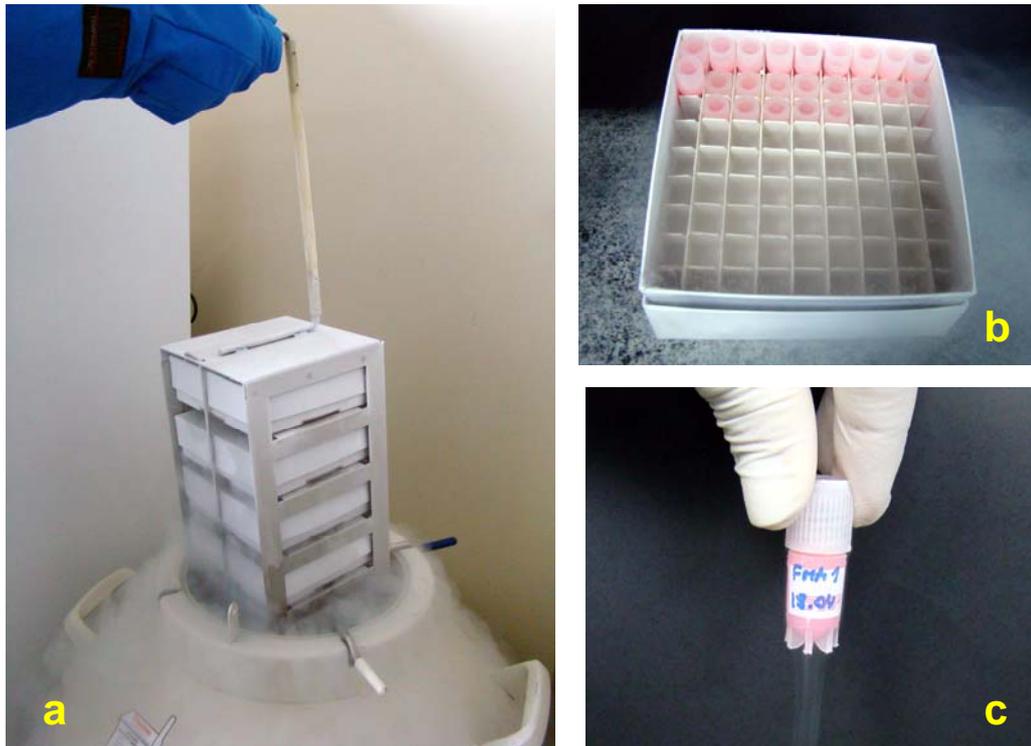


Figura 1 – a) remoção do puxador com as caixas do tambor de nitrogênio; b) caixa de acondicionamento de tubos criogênicos; c) tubo criogênico contendo as células FMM1

4.1.2 Troca de meio

A cada 48 horas o meio de cultura foi trocado. As células foram removidas da estufa e verificadas no microscópio. O meio de cultura foi aspirado e em seguida as células foram lavadas com PBS para remoção de células mortas. Um novo meio de cultura foi então adicionado ao frasco, o qual foi levado novamente para a estufa.

4.1.3 Subcultura

Quando as células cresceram a ponto de ocupar quase todo o frasco (80% de confluência) foi necessário realizar subcultura, passando as células de um frasco para dois ou mais, de acordo com o crescimento celular. As células removidas da estufa foram levadas à capela de fluxo laminar, onde o meio de cultura presente no frasco de cultivo foi retirado com auxílio de um pipetador automático (High Tech Lab, Poland) e reservado em um tubo de ensaio. As células foram então lavadas com 5 ml de PBS (Figura 2a) que foi aspirado em seguida. Foi adicionado ao frasco 5 ml de tripsina (Figura 2a), utilizada para destacar as células. O frasco com tripsina foi levado à estufa onde permaneceu por 3 minutos e em seguida leves batidas no fundo do frasco foram realizadas, para auxiliar na remoção destas. Estando as células prontas, o meio de cultura reservado foi colocado sobre elas, neutralizando a tripsina. Todo este conteúdo foi levado à centrífuga para obtenção do *pelet*. O sobrenadante foi novamente aspirado e as células ressuspensas em 1 ml de meio fresco e após bem homogeneizada, a suspensão foi dividida em dois ou mais frascos de mesmo tamanho, contendo 10 ml de meio de cultura, preparados previamente (Figura 2b). Os frascos foram levados novamente à estufa, onde permaneceram até a troca de meio e/ou realização de uma nova subcultura. Esse procedimento foi realizado até que as células atingissem a quinta passagem e estivessem em quantidade suficiente para realização da contagem e do plaqueamento.



Figura 2 - a) meio de cultura (DMEM), PBS e tripsina; b) frascos utilizados para realização de subcultura de células.

4.1.4 Contagem de células

A contagem de células foi realizada antes do plaqueamento a fim de que a mesma quantidade de células fosse colocada em cada poço das placas. Foram realizados os mesmos passos da subcultura até a obtenção do *pelet*; sendo que nesse caso, as células foram ressuspensas em 10 ml de meio fresco. Dessa suspensão, foram retirados 10 μ l, os quais foram levados à câmara de Neubauer (Labor Optik

GmbH, Germany), que foi levada ao microscópio de luz invertida para realizar a contagem das células presentes nos quatro quadriláteros periféricos (Figura 3).

Para obtenção da quantidade de células por ml, foi utilizada a seguinte fórmula:

$$C \times 10^4 = n^{\circ} \text{ células/ml}$$

Onde **C** corresponde à média das células viáveis encontradas nos quadriláteros periféricos. Foram plaqueadas 2000 células em 200 μ l de meio em cada poço.

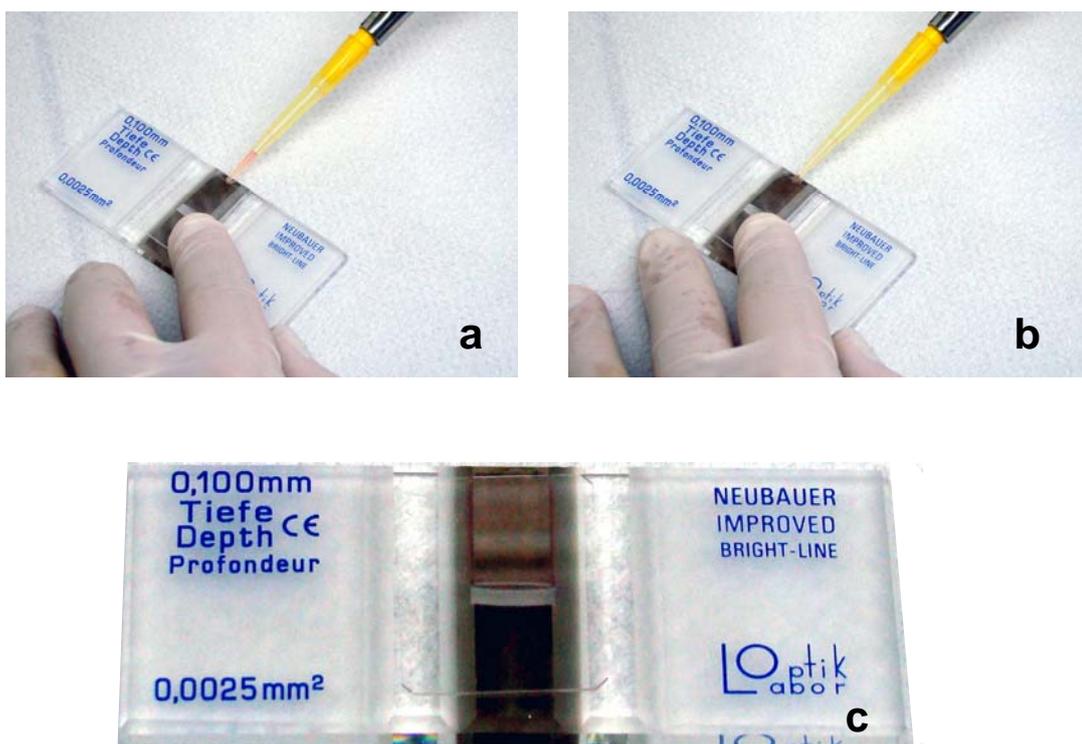


Figura 3 – Realização da contagem celular: a) e b) 10 μ l de meio com c sendo na câmara de Neubauer; c) câmara de Neubauer para contagem celular.

4.2 Plaqueamento

Foram utilizadas 2 placas de 96 poços para cada período de avaliação, uma para o grupo experimental e uma para o grupo controle, totalizando 4 placas para cada repetição do experimento. Em cada período, foram utilizados quatro espécimes (poços) por grupo. As placas foram levadas à estufa a 37° C onde permaneceram por 24 horas, até o momento da colocação do meio de cultura condicionado. Foram realizados três experimentos independentes, obtendo assim, 12 espécimes por período, para cada grupo experimental.

4.3 Levantamento da curva padrão de viabilidade e crescimento celular

A curva padrão de viabilidade e crescimento celular foi obtida através da avaliação das células cultivadas sem aplicação dos tratamentos em teste. Para obtê-la, as células plaqueadas foram submetidas à avaliação através do ensaio com MTT nos períodos de 24 e 48 horas. Foram avaliados doze espécimes para cada período, que corresponderam ao grupo controle.

4.4 Divisão dos grupos experimentais

Foram testados os seguintes agentes clareadores: associação do perborato de sódio com água destilada (Farmácia Byofórmula – São José dos Campos) (PS+ H₂O); associação do perborato

de sódio (Farmácia Byofórmula – São José dos Campos) com o peróxido de carbamida 20% (Opalescence PF, Ultradent – South Jordan – Utah-USA) (PS + PC 20%); o peróxido de carbamida 20% (Opalescence PF, Ultradent – South Jordan – Utah- USA) (PC 20%); associação do perborato de sódio (Farmácia Byofórmula – São José dos Campos) com o peróxido de hidrogênio 35% (Opalescence Endo, Ultradent – South Jordan_ - Utah - USA) (PS + PH 35%) e o peróxido de hidrogênio 35% (PH 35%) (Opalescence Endo, Ultradent – South Jordan_ - Utah - USA) (Quadro 1) (Figura 4). O controle utilizado correspondeu à curva padrão de crescimento e viabilidade celular.

Quadro 1 – Divisão dos grupos experimentais

Grupo Experimental	N	Agente de condicionamento do meio
G1	12	Perborato de sódio + água destilada
G2	12	Perborato de sódio + Peróxido de carbamida 20%
G3	12	Peróxido de carbamida 20%
G4	12	Perborato de sódio + Peróxido de hidrogênio 35%
G5	12	Peróxido de hidrogênio 35%

Cada grupo foi avaliado em períodos de 24 e 48h, utilizando-se o ensaio com MTT, conforme descrito para curva padrão de viabilidade e crescimento celular. Para cada período foram coletados 12 espécimes de cada um dos grupos.



Figura 4- Agentes clareadores: a) Perborato de Sódio; b) Peróxido de Carbamida 20%; c) Peróxido de Hidrogênio 35%.

4.5 Condicionamento do meio de cultivo

Os agentes clareadores foram preparados de acordo com as instruções do fabricante e colocados em tubos Falcon. A mistura do perborato de sódio com água destilada, peróxido de hidrogênio e peróxido de carbamida foi realizada em uma placa de vidro e posteriormente colocada em um tubo Falcon. Em cada tubo foi colocado 0,4 g de agente clareador e em seguida 2 ml de meio de cultura fresco, mantendo a proporção preconizada pela *American Society for Testing Materials* (Cavalcanti, 2003). Este método, descrito por Freshney, 2000, e empregado por Cavalcanti, 2003, simula a situação de contato dos produtos liberados pelo material em teste (clareador) com camadas mais profundas dos tecidos, onde não há contato direto entre as células e o material e sim com os produtos liberados por estes. O meio foi mantido em contato com o agente clareador por trinta minutos, em estufa atmosférica a 37° C com tensão de CO₂ a 5%. Após o condicionamento, 200 µl do meio condicionado foi colocado em cada poço correspondente (contendo células) a cada grupo experimental, onde permaneceram por mais trinta minutos em estufa atmosférica a 37° C com tensão de CO₂ a 5%. Após

este período o meio condicionado foi substituído por meio fresco e as análises com MTT foram realizadas nos períodos previstos.

4.6 Avaliação da viabilidade e crescimento celular

A avaliação da viabilidade celular foi feita através da coloração pelo MTT, que é reduzido pelas células vivas, adquirindo coloração azul.

A avaliação foi realizada pela mensuração da atividade mitocondrial celular através do brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolium (MTT). Este ensaio baseia-se na medida do dano induzido pela substância no metabolismo celular de glicídeos, usualmente através da atividade de desidrogenases. A atividade celular é quantificada pela redução do MTT. As reações com o MTT são usadas para localizar a atividade de desidrogenases presentes em células viáveis. O sal de tetrazólio não reage diretamente com as desidrogenases, mas com os produtos da reação do NADH ou NADPH (formas reduzidas da nicotinamida adenina dinucleotídeo e nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfatada, respectivamente, que atuam na glicólise e no ciclo de Krebs) que reduzem o MTT.

O ensaio com MTT foi realizado com o preparo do reagente, diluindo-se 0,5 mg de MTT (Sigma Aldrich Co., Germany) (Figura 5b) em 1 ml de solução de PBS. Como essa solução é sensível a luz, foi mantida protegida com papel alumínio. O meio de cultivo foi removido das placas e 100 µl da solução de MTT foram adicionados em cada poço. Cada placa foi então envolvida em papel alumínio e permaneceu na estufa por uma hora. Após este período, O MTT foi removido e foram adicionados 100 µl de DMSO (Sigma Aldrich Co., Germany) (Figura 5b) em cada poço, permanecendo na estufa por 10

minutos. Ao término deste período o conteúdo dos poços foi agitado por mais 10 minutos e a placa foi levada à leitora (Asys Hitech GmbH, Austria) (Figura 5a) previamente programada. A quantificação da inibição enzimática foi realizada em espectrofotômetro em comprimento de onda de 492 nm.

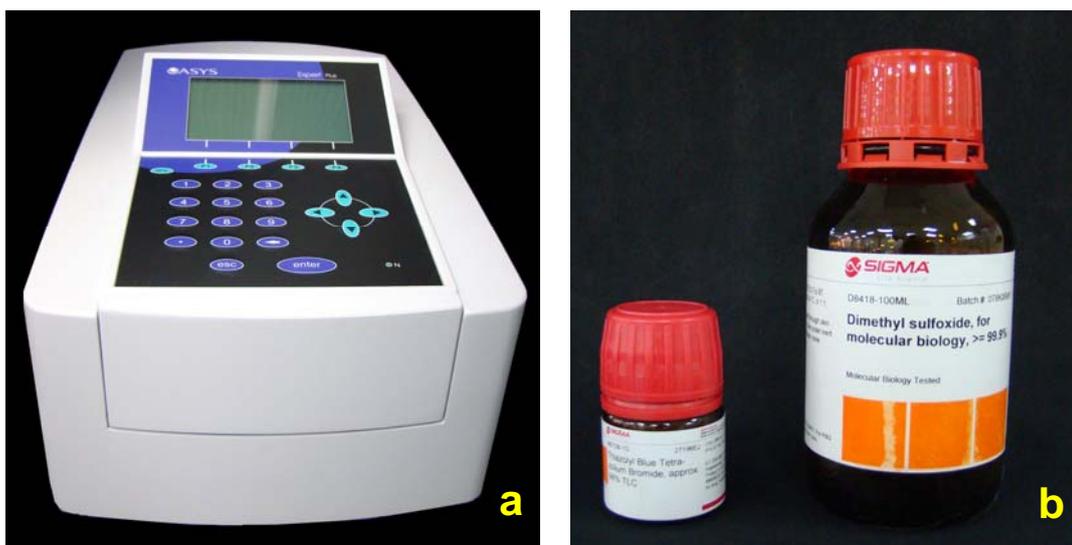


Figura 5 – Ensaio com MTT: a) leitora de microplacas (espectrofotômetro); b) DMSO e MTT.

4.7 Mensuração da quantidade de peróxido de hidrogênio liberado no meio

O condicionamento do meio de cultura fez com que o agente clareador liberasse peróxido de hidrogênio no mesmo. Dessa forma foi importante saber o quanto de peróxido foi efetivamente liberado a fim de relacionar este dado com o dano celular causado.

Para tornar possível esta etapa foi necessário conhecer a real concentração da solução de estoque de peróxido de hidrogênio, através da padronização do peróxido, para a obtenção de soluções de concentrações conhecidas de peróxido de hidrogênio que foram utilizadas

para o levantamento da curva padrão. Esta etapa, por sua vez, também foi de extrema importância para obter-se a quantidade de peróxido de hidrogênio liberada nos meios de cultura em µg.

4.7.1 Padronização do peróxido de hidrogênio

A padronização da solução de peróxido de hidrogênio foi realizada pelo método da iodometria, reação do peróxido com solução de iodeto de potássio 1M em meio ácido, liberando iodo, resultando numa solução âmbar escuro. O iodo liberado foi titulado com uma solução padronizada de tiosulfato de sódio 1M, adicionada gota a gota, até que todo o iodo dissolvido na solução foi consumido e esta se tornou incolor. Durante este processo, ocorreram as seguintes reações:



4.7.1.1 Preparo das soluções:

Para a realização da padronização foram preparadas as seguintes soluções:

- Solução de iodeto de potássio

Foram dissolvidos 16,6g de iodeto de potássio (KI – Merck, Germany) p.a. em 100ml de água deionizada, obtendo-se uma solução de 1,0M;

- Solução padrão de tiosulfato de sódio

Foram pesados 6,205g de tiosulfato de sódio pentahidratado p.a. ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ – Sigma Aldrich Co., Germany) e dissolvidos em 250ml de água deionizada para a obtenção da solução padrão de tiosulfato de sódio 0,1N;

- Solução de amido

Foram dissolvidos 0,25g de amido solúvel p.a. (Synth – Labsynth Ltda, São Paulo, Brasil) em 50ml de água deionizada, obtendo-se uma solução de amido a 5,0g/l. A solução foi fervida durante cinco minutos e após seu resfriamento, foi filtrada com algodão;

- Mistura ácida

Em um Becker submetido a banho de gelo, foram dissolvidos 0,09g de Molibdato de amônio tetra hidratado p.a. [$(\text{NH}_4)\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ – Sigma Aldrich, Germany] em 375,0ml de água deionizada.

O molibdato de amônio serviu como catalisador da reação. Em seguida, foram vagarosamente acrescentados 160ml de ácido sulfúrico (H_2SO_4 – Cinética Química Ltda, Brasil), em resfriamento constante. A mistura ácida foi essencial para que ocorresse a reação e, portanto, liberação de iodo;

- Solução da amostra de peróxido de hidrogênio

Foram transferidos 5,0 ml da solução de peróxido de hidrogênio a 35% v/v (H_2O_2 a 35% v/v, Asepticper – Solvay, Peróxidos do Brasil Ltda, Brasil) para um balão volumétrico de 1000ml contendo 250,0

ml de água deionizada e duas gotas de ácido sulfúrico p.a. O volume do balão foi completado com água deionizada.

4.7.1.2 Titulação

Uma bureta de 25,0ml foi preenchida com a solução de tiosulfato de sódio 0,1N. Foram transferidos, com pipeta volumétrica, 20,0ml da solução de peróxido de hidrogênio para um erlenmeyer contendo 200,0ml de água deionizada, assim como 10,0ml da solução de iodeto de potássio 1,0M e 25,0ml da mistura ácida. O frasco foi agitado, tampado e permaneceu em repouso em local escuro durante dez minutos.

A solução do erlenmeyer foi titulada com a solução de tiosulfato de sódio, adicionando gotas da solução de amido próximo ao ponto de viragem, até se obter uma solução incolor. A quantidade de solução de tiosulfato utilizada na titulação foi inserida no Quadro 2.

Quadro 2- Volume de Tiosulfato de Sódio 0,1 N gastos na titulação da amostra de peróxido de hidrogênio

Amostra	Volume de Tiosulfato de Sódio (ml)
A1	23,4
A2	23,4
A3	23,4
Média	23,4

Paralelamente, duas provas em branco foram realizadas, nas mesmas condições da amostra, porém isentas da solução de peróxido de hidrogênio (Quadro 3).

Quadro 3 – Volumes de tiosulfato de sódio 0,1N gastos na titulação do Branco

Amostra	Volume de Tiosulfato de Sódio (ml)
B1	0,25
B2	0,25
Média	0,25

A concentração da solução de peróxido de hidrogênio em g/l foi calculada empregando-se a fórmula:

$$C = \frac{(A - B) \cdot 85,04}{V}$$

Sendo:

A= Volume de Tiosulfato de sódio gasto na titulação da amostra;

B= Volume de Tiosulfato de sódio gasto na titulação do branco;

C= Concentração da Solução de peróxido de hidrogênio;

V= Volume da Amostra de peróxido de hidrogênio pipetada para diluição, em ml.

$$C = \frac{(23,4 - 0,25) \times 85,04}{5} = 393,74 \text{ g/l}$$

Assim:

A padronização do peróxido de hidrogênio foi necessária para confirmar a concentração real da solução de peróxido de hidrogênio, que serviu como parâmetro para o preparo de soluções padrões, com volumes conhecidos de peróxido de hidrogênio, para que fosse obtida a curva padrão.

4.7.2 Levantamento da curva padrão

A curva padrão foi necessária para possibilitar a conversão dos valores de peróxido de hidrogênio liberado em microgramas de peróxido de hidrogênio.

4.7.2.1 Preparo das soluções

- Solução de corante violeta leucocristal

Foram pesados 30,0 mg do corante violeta leucocristal (Sigma Aldrich, Germany) e dissolvidos em 60,0ml de solução de ácido clorídrico (HCl 0,5% v/v – Merck, Brasil), obtendo-se uma solução de 0,5mg/ml;

- Solução tampão de acetato

a) preparo da solução de acetato de sódio 2,0M/l
($\text{CH}_3\text{COONa}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$)

1 mol = 136,08g-----1litro

2M/l = 272,16g-----1litro

x = 27,22g/ 0,1 litro

Dissolver 27,22g de acetato de sódio trihidratado (Ecibra, Brasil) e completar o volume para 100ml com água deionizada;

b) preparo da solução de ácido acético 2,0M/l

Densidade do ácido acético $d=1,05\text{g/ml}$, $PM= 60,05\text{g}$

Sendo 1mol/l ----- 60,05 g/litro

2moles/l ---- 120,10 g/litro

Para o preparo de 100 ml tem-se 12,01 g. Sendo $d = m/v$, o volume de ácido acético (Merck, Alemanha) será 11,44ml;

c) preparo do tampão acetato

O tampão acetato foi obtido pela mistura de volumes iguais de acetato de sódio 2,0M/l e ácido acético 2,0M/l, ajustando-se o pH em 4,5 em pHmetro calibrado (HANNA – modelo HI9224) com ácido acético glacial concentrado p.a.

- Solução de peroxidase extraída de rábano silvestre (Cochlearia armoracia)

Foram pesados 10,0mg de peroxidase (peroxidase from horseradish P6782 – Sigma Aldrich, Germany) e dissolver em um mínimo de água deionizada. Transferir para um balão volumétrico de 10ml e completar cuidadosamente o volume com água deionizada. Sendo que esta solução deve ser preparada no momento de sua utilização.

- Soluções padrão de peróxido de hidrogênio

a) preparo de 100ml solução de H_2O_2 (Asepticper – Solvay, Peróxidos do Brasil Ltda) de concentração 5000 μ g/ml = 0,005g/ml.

100ml x 0,005g/ml = 0,5g/100ml de solução

1ml de solução concentrada de

H_2O_2 ~35% --- 0,39373 g/ml

x --- 0,5g x = 1,27ml de H_2O_2 35%

Todas as soluções foram preparadas em tampão acetato.

Foram necessários 1,27ml da solução de H₂O₂ 35% para se obter 0,5g de H₂O₂.

Adicionou-se 1,27 ml da solução de H₂O₂ ~35% em balão de 100ml e completou-se o volume com solução tampão acetato.

b) preparo da solução de H₂O₂ de concentração 50 µg/ml

Diluir a 1ml da solução de 5000 µg/ml a 100ml com tampão acetato. Dessa forma, cada 1ml terá 50µg de H₂O₂.....50µg H₂O₂/ml. Esta solução serviu de base para que novas diluições fossem realizadas, a fim de obter-se amostras contendo 0,5/1,0/1,5//2,0/2,5µg de peróxido de hidrogênio, de acordo com o Quadro 4.

Quadro 4 – Diluições realizadas para obtenção de amostras contendo de 0,5 a 2,5 µg de peróxido de hidrogênio

Volume(em µl) da solução padrão de 50 µg/ml	Volume (em µl) da solução tampão	Concentração do padrão
50	50	2,5
40	60	2,0
30	70	1,5
20	80	1,0
10	90	0,5

4.7.2.2 Leitura em espectrofotômetro

Cada concentração de peróxido de hidrogênio foi feita em triplicata, totalizando 15 tubos de ensaio. Em cada tubo foram introduzidos 2750µl de água deionizada, 100µl de solução de corante violeta leucocristal, 100µl de solução padrão de peróxido de hidrogênio e 50µl de solução de peroxidase. Para as diferentes concentrações de peróxido foram obtidas diferentes graduações de azul.

Paralelamente às amostras, foram realizadas duas provas em branco, nas mesmas condições citadas anteriormente, porém isentas da solução padrão de peróxido de hidrogênio.

De cada tubo de ensaio foram extraídos 2,0ml utilizando-se uma micropipeta (P1000 - Pipetman, Gilson S.A. B.P. 45-954000 Villers-le-Bel – France) e colocados em uma cubeta, levada ao espectrofotômetro (UV-Vis Spectrophotometer UV-1203 - Shimadzu) a um comprimento de onda de 596nm.

Os valores das concentrações das soluções padrão utilizadas e de absorbância relativas às concentrações foram submetidos a uma regressão linear dos pontos encontrados, utilizando-se o programa computacional Graph-Pad Prism, versão 3,0 (GraphPad Software Inc., San Diego, Califórnia, U.S.A), representados por uma reta (Figura 6).

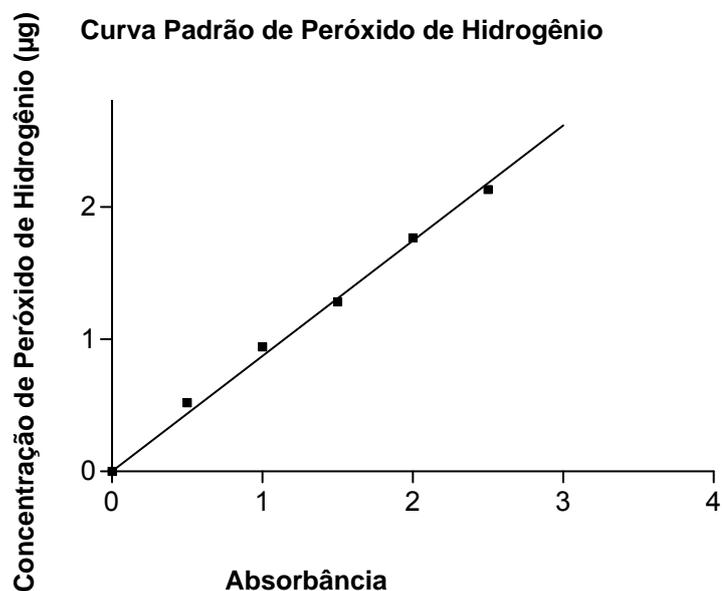


Figura 6 – Representação gráfica dos valores de absorbância para as diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio.

A partir da curva linear obtida, pôde-se extrair o fator de calibração (Fc), que corresponde à razão entre a concentração da solução padrão de peróxido de hidrogênio e sua respectiva absorbância, e está demonstrado na fórmula:

$$F_c = \frac{\text{solução padrão}}{\text{absorbância}}$$

O fator de calibração foi necessário na conversão dos dados das amostras experimentais em microgramas de peróxido de hidrogênio. Para cada ponto da curva linear que representa a concentração da solução padrão e sua respectiva absorbância, existe um fator de calibração. Foram calculados os fatores de calibração a partir de cada ponto da curva, sendo o valor médio:

$$F_c = 1,145$$

4.7.3 Mensuração do peróxido de hidrogênio liberado nas condições experimentais

Após estudo piloto observou-se que não seria possível mensurar a quantidade de peróxido de hidrogênio liberada diretamente no meio de cultura, pois a cor do meio interfere na leitura do espectrofotômetro, inviabilizando a metodologia empregada. Assim, optou-se por substituir o meio de cultura por solução tampão de acetato 2M a fim de possibilitar a quantificação do peróxido de hidrogênio.

As soluções de tampão de acetato, peroxidase e corante violeta leucocristal foram preparadas de acordo com o descrito para o levantamento da curva padrão.

Foram pesados 0,2g de cada um dos agentes clareadores em tubos Falcon. Sobre o gel foram adicionados 2ml de solução tampão de acetato. Os tubos foram levados à estufa a 37°C, onde permaneceram por trinta minutos. Em seguida, 100µl de cada placa foram removidos e colocados em um tubo de ensaio. Este procedimento foi realizado três vezes para cada situação experimental, totalizando 18 tubos de ensaio. Em cada tubo foram adicionados 2750µl de água deionizada, 100µl de solução de corante violeta leucocristal e 50µl de solução de peroxidase. Da solução obtida, 2ml foram removidos, colocados em uma cubeta e levados para leitura em espectrofotômetro a 596nm. A partir do fator de calibração obtido com o levantamento da curva padrão foi possível quantificar o peróxido liberado no meio durante o condicionamento em µg de peróxido.

4.8 Análise Estatística

As variáveis experimentais para avaliação da viabilidade celular foram: o agente clareador (perborato de sódio + água destilada; perborato de sódio + peróxido de carbamida 20%; peróxido de carbamida 20%; perborato de sódio + peróxido de hidrogênio 35%; peróxido de hidrogênio 35%; controle- sem agente clareador) e o tempo de avaliação (24 e 48 horas). Assim, o resultado foi um experimento seguindo um esquema fatorial do tipo 6 x 2, resultando em 12 condições experimentais sob 12 repetições.

A variável resposta foi o metabolismo celular mensurado indiretamente através do ensaio com MTT.

Os 144 dados obtidos (12 condições experimentais multiplicadas por 12 repetições) para a viabilidade celular foram submetidos à análise estatística por meio dos programas computacionais: MINITAB (Minitab, version 14.12, 2004) e STATISTIX for Windows (version 8.0, StatSoft Inc, 2000).

5 RESULTADOS

5.1 Avaliação da viabilidade celular

Os resultados obtidos a partir da leitura em espectrofotômetro correspondem indiretamente à atividade do metabolismo das células, pois representam a inibição da atividade da succinil desidrogenase ocasionada pelo peróxido de hidrogênio, indicativa de função mitocondrial. Os resultados presentes nas tabelas 1, 2, 3, 4 e 5 correspondem a viabilidade celular, de cada grupo experimental expressos em porcentagem em relação às médias dos grupos controles (100%), de acordo com cada período de avaliação.

Tabela 1 – Porcentagem de viabilidade celular para o grupo 1 (PS+H₂O)

Grupo 1		
Espécime	24 horas	48 horas
1	6,80	2,40
2	2,72	1,20
3	4,08	2,40
4	0,00	3,60
5	5,44	2,40
6	6,80	2,40
7	5,44	4,80
8	1,36	3,60
9	6,80	0,00
10	10,88	0,60
11	13,60	0,00
12	14,96	1,80

Tabela 2 - Porcentagem de viabilidade celular para o grupo 2 (PS+PC20%)

Grupo 2		
Espécime	24 horas	48 horas
1	20,41	40,82
2	17,69	44,42
3	6,80	42,02
4	0,00	43,82
5	12,24	31,21
6	12,24	33,01
7	21,77	30,61
8	20,41	25,21
9	12,24	1,80
10	16,33	2,40
11	19,05	3,00
12	19,05	0,00

Tabela 3 – Porcentagem da viabilidade celular para o grupo 3 (PC20%)

Grupo 3		
Espécime	24 horas	48 horas
1	20,41	54,62
2	17,69	46,82
3	29,93	6,42
4	5,44	40,22
5	0,00	39,62
6	14,97	42,62
7	25,85	57,62
8	4,08	49,22
9	91,16	31,81
10	137,42	60,62
11	100,00	52,22
12	100,00	30,012

Tabela 4 – Porcentagem da viabilidade celular para o grupo 4 (PS+PH35%)

Grupo 4		
Espécime	24 horas	48 horas
1	14,97	10,80
2	14,97	77,43
3	9,52	23,41
4	4,08	52,82
5	8,16	51,62
6	10,88	56,42
7	14,97	46,82
8	12,24	82,83
9	14,97	10,80
10	25,85	16,21
11	38,10	9,60
12	34,01	7,80

Tabela 5 – Porcentagem da viabilidade celular para o grupo 5 (PH35%)

Grupo 5		
Espécime	24 horas	48 horas
1	9,52	55,82
2	8,16	61,22
3	12,24	63,03
4	0,00	51,62
5	8,16	33,61
6	5,44	11,40
7	9,52	66,63
8	1,36	48,62
9	14,97	5,40
10	20,41	3,60
11	24,49	6,00
12	23,13	1,20

5.2 Quantificação do peróxido de hidrogênio

A partir do fator de calibração previamente calculado, foi possível calcular a quantidade de peróxido de hidrogênio liberada na simulação das condições experimentais realizadas, apresentadas na tabela 6.

Tabela 6 – Quantidade de peróxido de hidrogênio (μg) liberada na simulação das condições experimentais

GRUPOS	Média
Grupo 1 (PS + H ₂ O)	1,740
Grupo 2 (PS + PC20%)	1,119
Grupo 3 (PC 20%)	1,215
Grupo 4 (PS + PH 35%)	1,850
Grupo 5 (PH 35%)	1,779

A Figura 7 representa graficamente a quantidade de peróxido de hidrogênio liberada em cada uma das condições experimentais.

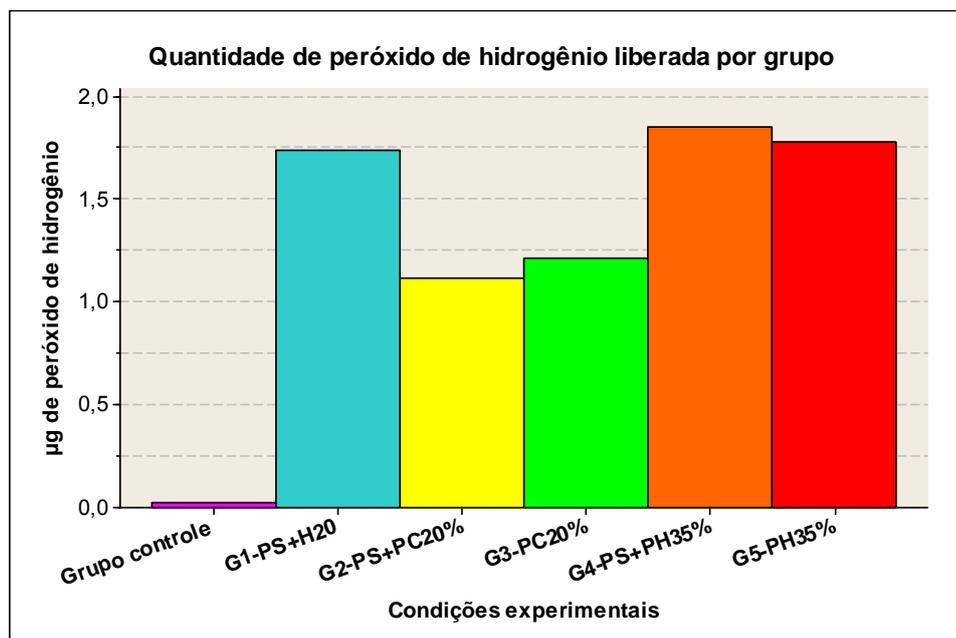


Figura 7 – Gráfico de barras ilustrando a quantidade de peróxido de hidrogênio liberada em cada uma das condições experimentais.

5.3 Análise Estatística

5.3.1 Estatística Descritiva

5.3.1.1 Estatística descritiva para viabilidade celular

A Figura 8 apresenta o Gráfico de colunas e médias comparando os resultados da viabilidade celular obtidos em cada uma das condições experimentais, através do ensaio com MTT.

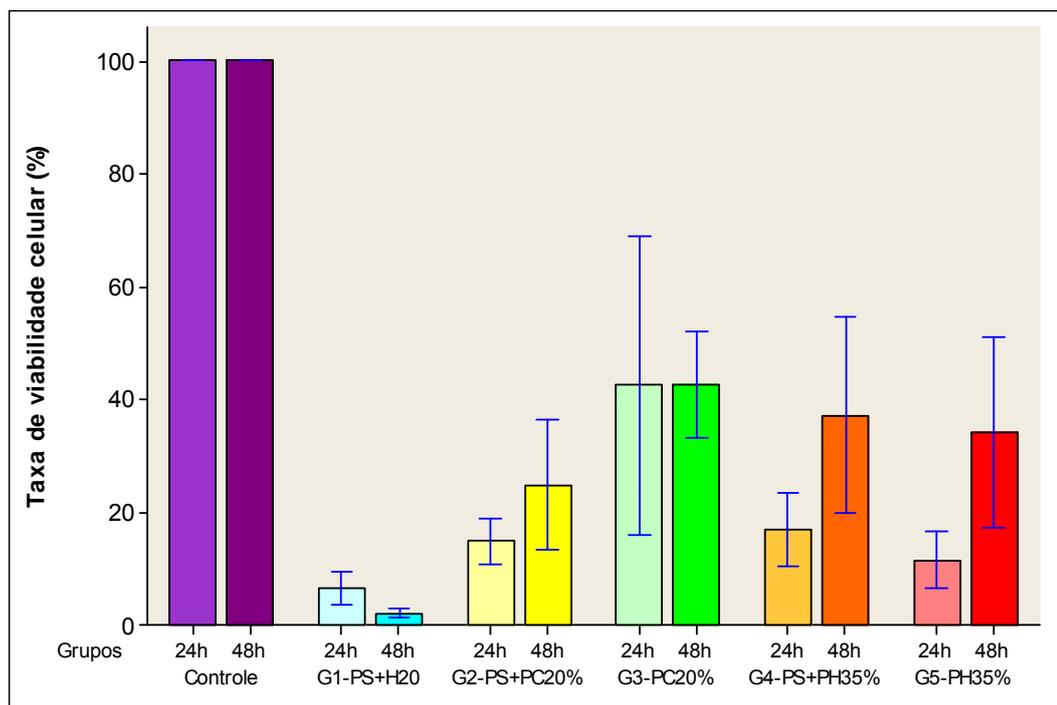


Figura 8 – Representação gráfica dos resultados para cada uma das condições experimentais.

As Tabelas 7 e 8 mostram o resultado da análise estatística descritiva para os diferentes tempos de avaliação.

Tabela 7 - Estatística descritiva dos valores de porcentagem da viabilidade celular obtido na avaliação após 24 horas

GRUPOS	Agente clareador	n	Média	Desvio Padrão	Mediana
Controle	Sem tratamento	12	100,00	0	100,00
Grupo 1	PS + H2O	12	6,58	4,60	6,12
Grupo 2	PS + PC 20%	12	14,85	6,47	17,01
Grupo 3	PC20%	12	42,46	47,50	23,10
Grupo 4	PS + PH 35%	12	16,89	10,40	14,97
Grupo 5	PH 35%	12	11,45	7,96	9,52

Tabela 8 - Estatística descritiva dos valores de porcentagem da viabilidade celular obtido na avaliação após 48 horas

GRUPOS	Agente clareador	n	Média	Desvio Padrão	Mediana
Controle	Sem tratamento	12	100,00	0	100,00
Grupo 1	PS + H ₂ O	12	2,10	1,48	2,40
Grupo 2	PS + PC 20%	12	24,86	18,00	30,91
Grupo 3	PC20%	12	42,65	14,92	44,72
Grupo 4	PS + PH 35%	12	37,21	27,41	35,11
Grupo 5	PH 35%	12	34,01	26,56	41,12

A Tabela 9 apresenta a média da porcentagem da viabilidade celular para cada grupo nos diferentes tempos de avaliação.

Tabela 9 - Valores referentes à atividade do metabolismo celular nos diferentes tempos de avaliação.

GRUPOS	Agente clareador	24h	48h
Controle	Sem tratamento	100,00	100,00
Grupo 1	PS + H ₂ O	6,58	2,10
Grupo 2	PS + PC 20%	14,85	24,86
Grupo 3	PC20%	42,45	42,65
Grupo 4	PS + PH 35%	16,89	37,21
Grupo 5	PH 35%	11,45	34,01

A Figura 9 ilustra a média da porcentagem da viabilidade atividade celular de todos os grupos avaliados nos diferentes períodos de avaliação.

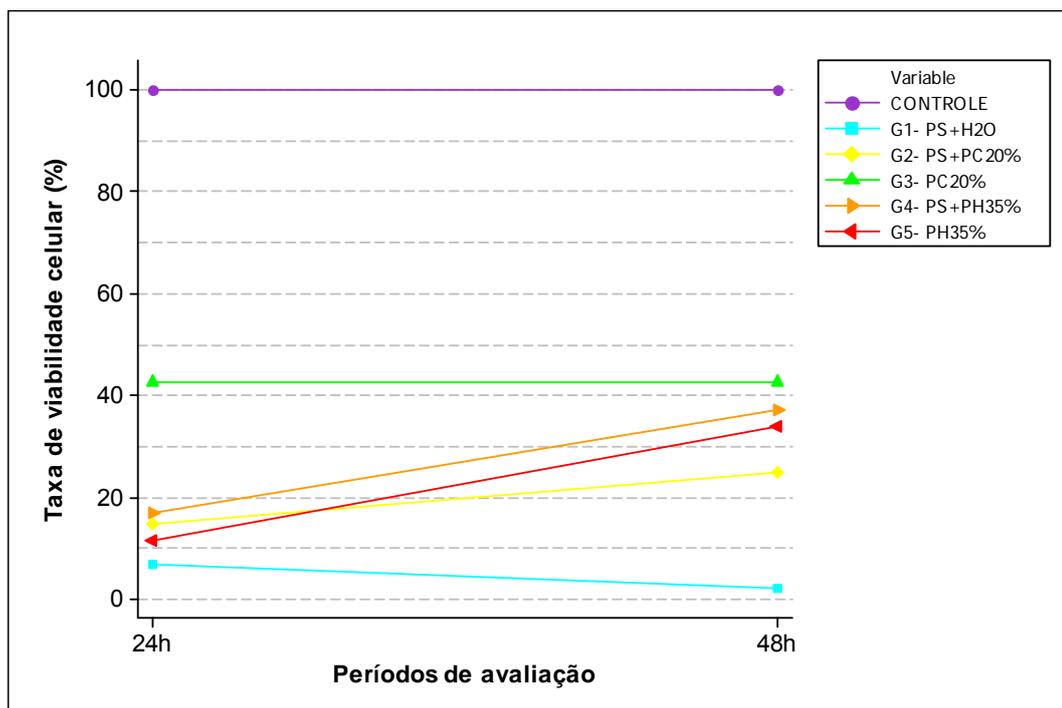


Figura 9 – Gráfico das médias da porcentagem da viabilidade celular dos grupos experimentais em relação ao grupo controle.

5.3.2 Teste de Anova

O teste de Anova foi utilizado para a avaliação da viabilidade celular dos grupos experimentais em relação ao do grupo controle. O resultado mostrou que todos os grupos experimentais em qualquer período de avaliação diferem do grupo controle $p < 0,05$ (Tabela 10). Foi também utilizado para verificar se o período de avaliação (24 e 48 horas) apresentava diferença estatisticamente significativa para o grupo controle e para cada um dos grupos experimentais. O resultado mostrou que apenas nos grupos 2 (PS + PC20%) e 3 (PC20%) a variável tempo não foi significativa ($P > 0,05$) (Tabela 11).

Tabela 10 – Teste ANOVA para viabilidade celular dos grupos experimentais em relação ao grupo controle

GRUPOS	P
Grupo 1 (PS+H ₂ O)	0,000*
Grupo 2 (PS+PC20%)	0,000*
Grupo 3 (PC20%)	0,000*
Grupo 4 (PS+PH35%)	0,000*
Grupo 5 (PH35%)	0,000*

*Valores estatisticamente significante ($p \leq 0,05$).

Tabela 11–Teste ANOVA para agentes clareadores em relação ao tempo

Condições experimentais	Valores de p dos agentes clareadores testados relação ao tempo
Grupo controle - 24h x 48h	p= 0,0000*
Grupo 1 (PS+H ₂ O) - 24h x 48h	p= 0,004*
Grupo 2 (PS+PC20%) - 24h x 48h	p= 0,0836
Grupo 3 (PC20%) - 24h x 48h	p= 0,7086
Grupo 4 (PS+PH35%) - 24h x 48h	p= 0,0252*
Grupo 5 (PH35%) - 24h x 48h	p= 0,0100*

*Valores estatisticamente significante ($p \leq 0,05$).

5.3.3 Teste Tukey

O teste de Tukey foi aplicado a fim de verificar quais fatores dentro de cada variável apresentavam diferenças entre si. Letras iguais representam grupos sem diferença estatisticamente significativas (Tabelas 12, 13 e 14).

Tabela 12 - Teste de Tukey para a variável agente clareador no tempo 24 horas

Condição experimental	Grupos homogêneos		
Grupo controle	A		
Grupo 3 (PC20%)		B	
Grupo 4 (PS + PH35%)			C
Grupo 2 (PS + PC20%)			C
Grupo 5 (PH 35%)			C
Grupo 1 (PS + H ₂ O)			C

Tabela 13 - Teste de Tukey para a variável agente clareador no tempo 48 horas

Condição experimental	Grupos homogêneos		
Grupo controle	A		
Grupo 3 (PC 20%)		B	
Grupo 4 (PS + PH35%)		B	
Grupo 2 (PS + PC20%)		B	
Grupo 5 (PH 35%)		B	
Grupo 1 (PS + H ₂ O)			C

Tabela 14 - Teste de Tukey para a variável agente clareador

Condição experimental	Grupos homogêneos		
Grupo controle	A		
Grupo 3 (PC20%)		B	
Grupo 4 (PS + PH35%)		B	C
Grupo 5 (PH 35%)			C
Grupo 2 (PS + PC20%)			C
Grupo 1 (PS + H ₂ O)			D

6 DISCUSSÃO

Esse estudo avaliou a citotoxicidade de agentes clareadores de uso interno em cultura celular humana. Sua relevância está no fato de que durante o processo de clareamento, o peróxido de hidrogênio atua como um forte agente oxidante, levando a formação de radicais oxidativos, moléculas reativas de oxigênio e ânions de peróxido de hidrogênio (Gregus; Klaassen, 1995); sendo essas moléculas reativas, as responsáveis pelo efeito clareador, transformando moléculas escuras de cadeias longas em moléculas menores, mais solúveis e mais claras (Dahl; Pallassen, 2003). O peróxido de hidrogênio, através da formação de radicais oxidativos parece ser capaz de causar danos às estruturas de DNA, causando morte celular e bacteriana. Alguns estudos relataram o potencial carcinogênico dessa substância, quando administrada por via oral e cutânea em animais de laboratórios (IARC, 1999). Entretanto, devido aos poucos e limitados estudos realizados em animais e às pesquisas inadequadas em humanos, o peróxido de hidrogênio é considerado pela Agência Internacional de Pesquisa em Câncer, como uma substância sem classificação sobre seu efeito carcinogênico em humanos (IARC, 1999).

Durante o processo de clareamento dentário interno, os dentes, por já possuírem tratamento endodôntico, apresentam aumento da permeabilidade e diminuição da microdureza dentinária, ocasionada pelo uso de soluções irrigadoras e pelo desgastes dos instrumentos nas paredes do canal (Rotstein et al., 1996; Saleh; Ettman, 1999; Ari; Erdemir, 2005; Oliveira et al., 2007). O peróxido de hidrogênio independente do agente clareador utilizado atravessa a dentina e o cemento e alcança os tecidos periodontais (Helling et al., 1995; Carrasco et al., 2003; Lee et al,

2004; Gokay et al., 2008), exercendo aí efeitos que podem levar desde uma leve inflamação até o aparecimento de reabsorções externas (Harrington; Natkin 1979; Cvek; Lindvall 1985; Rotstein et al., 1992). Muitos autores acreditam que a penetração do peróxido da câmara pulpar para a superfície radicular externa ocorre e apresenta significância quando existe falha na junção esmalte-cimento (Cvek; Lindval, 1985; Rotstein, 1991; Rotstein et al., 1991), entretanto Palo, 2005 verificou que os íons dos agentes clareadores atravessaram a dentina e o cimento, mesmo em dentes onde não existiam fendas ou falhas na junção cimento-esmalte, verificada através da microscopia eletrônica de varredura (MEV). Apesar disso, Neuvald e Consolaro (2000) observaram em MEV áreas de “gaps” ao longo da junção amelocementária. Segundo Consolaro (2002), a saída do agente clareador por essas janelas ou pela própria permeabilidade do cimento pode induzir um processo inflamatório subclínico na área cervical gengival, dissolvendo a matriz extracelular ou o cimento afibrilar ou intermediário que protegem a superfície dentinária da exposição aos elementos celulares do tecido conjuntivo e das células reconhecedoras de antígenos. Há a liberação ou exposição dos antígenos da dentina e uma mobilização celular para removê-los da estrutura mineralizada, iniciando a reabsorção cervical externa. Além disso, os agentes clareadores durante o processo de clareamento, possuem a capacidade de aumentar a permeabilidade dentinária, facilitando a ocorrência desses efeitos deletérios (Dezotti et al., 2002; Carrasco et al., 2003; Carrasco et al., 2007).

Este trabalho utilizou um experimento *in vitro*, sobre um modelo de cultivo celular, que constitui um teste inicial para a avaliação de materiais empregados na Odontologia. Diferentes tipos de células podem ser utilizados para este tipo de análise, sendo que estas podem ser provenientes de linhagens imortalizadas ou de linhagens primárias (Schmalz, 1994; Freshney, 2000). Optou-se neste estudo pelo uso de células de linhagem primária, provenientes do tecido gengival humano

(FMM1), pelo fato destas células possuírem potencial metabólico específico mais próximo das condições *in vivo* (Schmalz, 1994; Koulaouzidou et al., 1998; Freshney, 2000).

Para os testes de citotoxicidade e genotoxicidade são utilizadas diferentes formas de contato dos agentes clareadores sobre as células. Hanks et al., 1993; Koulaouzidou et al., 1998 e Kinomoto et al., 2001, realizaram diluições do peróxido de hidrogênio, para avaliar a citotoxicidade dos agentes clareadores utilizados. Assim como Ribeiro et al., 2005, que ao avaliarem a genotoxicidade de agentes clareadores optaram por diluí-los. Já Aren, em 2003, condicionou o meio de cultura com o agente clareador antes da aplicação sobre as células. No presente estudo optou-se também pelo condicionamento do meio de cultura. Este método permite que durante o tempo em que o meio fica em contato com o agente clareador, ocorra liberação dos produtos desse agente para o meio. Após este período, o sobrenadante do meio é colocado em contato com as células, evitando o contato direto destas com os agentes clareadores. (Freshney, 2000; Cavalcanti et al., 2005).

O ensaio com o MTT (brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolium) vem sendo utilizado como um teste de citotoxicidade em culturas celulares devido sua rapidez e objetividade. O princípio desse teste baseia-se na capacidade das células viáveis em reduzirem o sal do MTT em seu metabolismo mitocondrial. Esse sal reduzido adquire uma coloração roxa, que pode ser mensurada em espectrofotômetro utilizando-se um leitor de Elisa (Kim et al., 2007). Este ensaio foi utilizado por muitos autores com a finalidade de avaliar a citotoxicidade de diversos materiais para aplicação na Odontologia (Chen et al., 2003; Jafarania et al., 2009; Lima et al., 2009), sendo também o teste de escolha para a realização do presente estudo, por oferecer resultados mais precisos, sendo sensível a pequenas alterações no metabolismo celular.

Os agentes clareadores normalmente utilizados para a técnica de clareamento interno “walking bleaching” são: peróxido de hidrogênio, peróxido de carbamida, perborato de sódio com água destilada e mais recentemente, a associação do perborato de sódio com os peróxidos de hidrogênio e carbamida (Gokay et al., 2008). Sendo estes os agentes clareadores escolhidos para os grupos experimentais do presente estudo.

O perborato de sódio em associação com a água destilada vem sendo recomendado por muitos autores (Weiger et al., 1994; Ari; Ungor, 2002; Attin et al., 2003) como o agente clareador mais seguro, quando da necessidade de se realizar clareamento interno. Apesar disso, no presente estudo verificou-se que esse agente clareador foi o mais citotóxico para a cultura celular e que a liberação de peróxido de hidrogênio no meio de cultivo por parte deste foi semelhante quando da utilização do peróxido de hidrogênio 35% (Grupo 5). Estes resultados não eram esperados, uma vez que estudos *in vitro* mostraram que ao avaliar a passagem do clareador da câmara pulpar para a superfície radicular externa, com o uso do perborato de sódio + água ocorre menor penetração de radicais oxidativos para esta área, quando comparado aos demais clareadores (Palo, 2005) e que o perborato de sódio quando associado à água é o agente clareador que menos aumenta a permeabilidade dentinária (Oliveira et al., 2007). Sendo assim, esperava-se menor efeito citotóxico desta associação. A maior ação citotóxica do perborato de sódio + água observada no presente estudo pode ser explicada pela forma física desta associação. A pasta de perborato de sódio com água destilada tornou-se mais solúvel no meio de cultura do que os outros agentes clareadores em forma de gel, liberando portanto maior quantidade de íons reativos que entram em contato com as células. Os estudos de Lee et al. em 2004 relataram que a liberação de peróxido de hidrogênio quando da utilização da pasta de perborato de sódio, foi semelhante à liberação quando da utilização do peróxido de hidrogênio

35% em dois períodos de avaliação, estando estes resultados de acordo com os encontrados no presente estudo, quando da liberação de peróxido.

O peróxido de carbamida 20% (grupo 3) mostrou ser o agente clareador menos tóxico para as células, já que nos dois períodos de avaliação foi o que apresentou maior viabilidade celular. Porém apenas no período de 24 horas a viabilidade celular encontrada nesse grupo foi estatisticamente significativa em relação aos outros, uma vez que na avaliação de 48 horas, essa viabilidade não mostrou diferença significativa em relação aos grupos 2 (PS + PC 20%), 4 (PS + PH 35%) e 5 (PH35%). Verificou-se que esse agente clareador (PC 20%) apresentou a segunda menor liberação de peróxido de hidrogênio quando comparou-se todos os agentes clareadores. Esses resultados estão de acordo com os de Lee et al. (2004) e os de Gokay et al. (2008), que demonstraram que o gel de peróxido de carbamida ocasiona baixa liberação de peróxido de hidrogênio quando comparado ao peróxido de hidrogênio 35% e à associação deste com o perborato de sódio, respectivamente.

Quando o peróxido de carbamida 20% foi associado ao perborato de sódio (Grupo 2), houve uma queda da porcentagem de viabilidade celular em relação à utilização do gel de peróxido de carbamida 20% sem associação (Grupo 3). Isso indica que provavelmente o perborato de sódio potencializou o efeito citotóxico do gel clareador e mostra mais uma vez que a forma física deste agente e sua missibilidade no meio interferem na toxicidade devido à possibilidade do meio ter agregado maior quantidade do clareador.

Em contrapartida, quando o peróxido de hidrogênio 35% foi associado ao perborato de sódio (grupo 4), ocorreu um aumento da porcentagem de viabilidade celular quando comparado ao gel de peróxido de hidrogênio 35% sem associação (grupo 5). Porém, essa diferença não foi estatisticamente significativa em nenhum dos dois períodos de avaliação. Esses resultados conflitam com os de Kinomoto et al. (2001),

que ao avaliarem a citotoxicidade de agentes clareadores, concluíram que a associação do peróxido de hidrogênio 30% com o perborato de sódio apresentou maior toxicidade em relação ao peróxido de hidrogênio 30%. Porém, esses autores utilizaram diluições dos agentes clareadores e quantificaram a viabilidade celular através do ensaio LDH (enzima lactato desidrogenase), diferindo, portanto da metodologia empregada neste estudo.

O gel de peróxido de hidrogênio 35%, apesar de ser o agente clareador mais conhecido e utilizado nas técnicas de clareamento dental, também é o mais estudado em relação a sua biocompatibilidade. Os resultados deste estudo mostraram que sua utilização leva a uma grande queda da viabilidade celular. Estes resultados também podem ser complementados pelos de Ribeiro et al. (2005), que ao analisarem a genotoxicidade de agentes clareadores, concluíram que o peróxido de hidrogênio 35% foi extremamente lesivo ao DNA celular.

Os resultados deste estudo mostraram que a alteração no metabolismo celular foi maior após 24 horas do contato com o agente clareador e que após 48 horas, exceto no grupo 1 (PS + H₂O), as células conseguiram se recuperar parcialmente, uma vez que o maior metabolismo celular após 48 horas foi 42,65% (PC 20%) quando comparado ao grupo controle, mostrando mais de 50% de queda da atividade celular após contato com o agente clareador. Kinomoto et al., 2001, ao avaliarem a citotoxicidade de agentes clareadores em culturas celulares, também observaram que inicialmente (24 horas) o peróxido de hidrogênio 30% foi mais tóxico do que a pasta de perborato de sódio, porém, após 72 horas, o perborato de sódio manteve seu efeito citotóxico, sendo superior ao do peróxido de hidrogênio. Estes resultados indicam que a pasta de perborato de sódio possui capacidade de manter-se ativa mesmo após longos períodos de avaliação, como foi demonstrado no presente estudo.

Verificou-se que na cultura celular sem aplicação de agente clareador (grupo controle) os valores de viabilidade celular foram estatisticamente maiores do que nos grupos experimentais, nos dois períodos de avaliação. Mostrando ainda que as células continuaram crescendo e se multiplicando no decorrer do experimento, uma vez que os valores de viabilidade encontrados no período de 48 horas são maiores do que nos de 24 horas. Este fato indica que a quantidade de células plaqueadas em cada poço da placa de cultura foi adequada, já que estas continuaram seguindo seu curso de desenvolvimento.

Os resultados deste condizem com aqueles encontrados por Hanks et al., 1993; Koulaouzidou et al., 1998 e Aren, 2003, que encontraram redução na viabilidade e crescimento celular após exposição a agentes clareadores, utilizando metodologias diferentes e confirmaram o efeito citotóxico desses agentes. Mesmo após a recuperação celular (48 horas) a viabilidade celular é bem inferior quando comparada às células que não receberam agente clareador. Estão de acordo também com os resultados encontrados por Lima et al., 2009 que ao utilizarem metodologia semelhante à desse estudo, concluíram que pequenas concentrações do gel clareador testado (0,1% de peróxido de Carbamida 10 %), foi capaz de provocar efeitos citotóxicos em odontoblastos MDPC-23, reduzindo seu metabolismo em cerca de 80%, quando comparado com o grupo controle.

Em relação à quantidade de peróxido de hidrogênio liberado na solução tampão de acetato (utilizada para simulação do meio de cultivo), os resultados deste estudo estão de acordo com os de Lee et al. (2004), que ao avaliarem a difusão de agentes clareadores verificaram que o peróxido de carbamida foi o agente clareador que provocou menor liberação de peróxido, seguido pelo perborato de sódio; e que o peróxido de hidrogênio 35 % foi o agente clareador que causou maior liberação.

O clareamento dental para dentes desvitalizados, mais conhecido como clareamento interno, tem-se mostrado uma técnica

importantíssima para recuperação da estética e harmonia do sorriso. No entanto, sua indicação deve ser extremamente cautelosa, uma vez que os resultados encontrados neste e em outros estudos indicam que os agentes clareadores, utilizados nessa técnica, podem causar efeitos tóxicos nas células e em seu material genético. A escolha e indicação de um agente clareador deve-se basear em sua biocompatibilidade, já que muitos estudos demonstraram que os agentes clareadores apresentam resultados estéticos semelhantes (Ari; Ungor, 2002; Lim et al., 2004; Souza- Zaroni et al., 2009). Portanto, deve optar-se por um agente clareador que propicie o efeito clareador desejado, minimizando os danos nos tecidos onde entram em contato. Apesar da confiabilidade e aplicabilidade do nosso estudo, sabemos da necessidade de realização de outras pesquisas sobre esse assunto, aprimorando a metodologia, especialmente na maneira de utilização do agente clareador. É provável que a diluição do agente clareador no meio diminua a variabilidade encontrada no presente estudo, devido às diferentes formas físicas dos produtos testados, possibilitando assim, diluir todos os agentes clareadores de forma semelhante. Portanto, novos estudos devem ser realizados e assim confirmarem qual o melhor agente a ser utilizado no processo de clareamento interno, na clínica diária.

7 CONCLUSÃO

De acordo com a metodologia empregada pode-se concluir que:

- todos os agentes clareadores testados foram citotóxicos, diminuindo significativamente o metabolismo e viabilidade celular;
- a associação do perborato de sódio com água destilada foi o agente clareador mais citotóxico e o peróxido de carbamida 20 % o menos citotóxico.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbott PV. Aesthetic considerations in endodontics: internal bleaching. *Pract Periodontics Aesthet Dent*. 1997;9(7):833-40.

Aren G. In vitro effects of bleaching agents on FM3A cell line. *Quintessence Int*. 2003;34(5):361-5.

Ari H, Erdemir A. Effects of endodontic irrigation solutions on mineral content of root canal dentin using ICP-AES technique. *J Endod*. 2005;31(3):187-9.

Ari H, Ungör M. In vitro comparison of different types of sodium perborate used for intracoronal bleaching of discoloured teeth. *Int Endod J*. 2002;35(5):433-6.

Attin T, Paque´ F, Ajam F, Lennon A´ M. Review of the current status of tooth whitening with the walking bleach technique. *Int Endod J*. 2003;36(5):313–29.

Azevedo CL, Marques MM, Bombana AC. Cytotoxic effects of cyanoacrylates use as retrograde filling material: an in vitro analysis. *Pesq Odontol Bras*. 2003;17(2):113-8.

Baratieri LN, Andrada MAC, Vieira LCC. *Clareamento dental*. São Paulo: Ed. Santos; 1993.

Benetti AR, Valera MC, Mancini MN, Miranda CB, Balducci I. *In vitro* penetration of bleaching agents into the pulp chamber. *Int Endod J*. 2004;37(2):120-4.

Camargo SE, Valera MC, Camargo CH, Gasparoto Mancini MN, Menezes MM. Penetration of 38% hydrogen peroxide into the pulp chamber in

bovine and human teeth submitted to office bleach technique. *J Endod.* 2007;33(9):1074-7.

Carrasco LD, Fröner IC, Corona SA, Pécora JD. Effect of internal bleaching agents on dentinal permeability of non-vital teeth: quantitative assessment. *Dent Traumatol.* 2003;19(2):85-9.

Carrasco LD, Zanello Guerisoli DM, Pécora JD, Fröner IC. Evaluation of dentin permeability after light activated internal dental bleaching. *Dent Traumatol.* 2007;23(1):30-4.

Cavalcanti BN, Rode SM, Marques MM. Cytotoxicity of substances leached or dissolved from pulp capping materials. *Int Endod J.* 2005;38(8):505-9.

Cavalcanti BN. Resposta de fibroblastos de polpa humanos submetidos a substâncias liberada por capeadores pulpares diretos [tese]. Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo; 2003.

Chen RS, Liu CC, Tseng WY, Jeng JH, Lin CP. Cytotoxicity of three dentin bonding agents on human dental pulp cells. *J Dent.* 2003;31(3):223-9.

Consolaro A. Reabsorções dentárias nas especialidades clínicas. Maringá: Ed. Dental Press; 2002. p.87-112.

Costa CAS. Teste de citotoxicidade em cultura de células. In: Estrela C. Metodologia científica: ensino e pesquisa em odontologia. São Paulo: Artes Médicas; 2001. p.146-60.

Cvek M, Lindvall AM. External root resorption following bleaching of pulpless teeth with oxygen peroxide. *Endod Dent Traumatol.* 1985;1(2):56-60.

Dahl JE, Becher R. Acute toxicity of carbamide peroxide and a commercially available tooth-bleaching agent in rats. *J Dent Res.* 1995;74(2):710-4.

Dahl JE, Pallesen U. Tooth bleaching--a critical review of the biological aspects. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2003;14(4):292-304.

Dezotti MS, Souza MH Jr, Nishiyama CK. Evaluation of pH variation and cervical dentin permeability in teeth submitted to bleaching treatment. *Pesqui Odontol Bras.* 2002;16(3):263-8.

Dostalova T, Jelinkova H, Housova D, Sulc J, Nemecek M, Miyagi M, Brugnera Jr A, Zanin F. Diode laser-activated bleaching. *Braz Dent J.* 2004;15 (Sp iss):SI 3-8.

Eldeniz AU, Mustafa K, Ørstavik D, Dahl JE. Cytotoxicity of new resin-, calcium hydroxide- and silicone-based root canal sealers on fibroblasts derived from human gingiva and L929 cell lines. *Int Endod J.* 2007;40(5):329-37.

Federation Dentaire Internationale. Recommended standard for biological evaluation of dental materials. *Int Dent J.* 1980; 30(2):140-88.

Freshney RI. *Culture of Animal Cell: a manual of basic technique.* 4th ed. Indianapolis: Wiley Liss; 2000.

Fuss Z, Szajkis S, Tagger M. Tubular permeability to calcium hydroxide and to bleaching agents. *J Endod.* 1989;15(8):362-4.

Gökay O, Ziraman F, Cali Asal A, Saka OM. Radicular peroxide penetration from carbamide peroxide gels during intracoronal bleaching. *Int Endod J.* 2008;41(7):556-60.

Goldstein CE, Goldstein RE, Feinman RA, Garber DA. Bleaching vital teeth: state of the art. *Quintessence Int.* 1989;20(10):729-37.

Goldstein GR, Kiremidjian-Schumacher L. Bleaching: is it safe and effective? *J Prosthet Dent.* 1993;69(3):325-8.

Goldstein RE, Garber DA. Complete dental bleaching. Chicago: Quintessence; 1995. 165p.

Gregus Z, Klaassen CD. Mechanisms of toxicity. In: Cassarett and Dull's Toxicology, the basic science of poisons. Klaassen CD, editor. New York: McGraw-Hill; 1995. p 35-74.

Halliwel B, Gutteridge JMC. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem J.* 1984;219(1):1-14.

Hanks CT, Fat JC, Wataha JC, Corcoran JF. Cytotoxicity and dentin permeability of carbamide peroxide and hydrogen peroxide vital bleaching materials, in vitro. *J Dent Res.* 1993;72(5):931-8.

Harrington GW, Natkin E. External resorption associated with bleaching of pulpless teeth. *J Endod.* 1979;5(11):344-48.

Haywood VB, Heymann HO. Nightguard vital bleaching. *Quintessence Int.* 1989;20(3):173-6.

Haywood VB, Heymann HO. Nightguard vital bleaching: how safe is it? *Quintessence Int.* 1991;22(7):515-23.

Heling I, Parson A, Rotstein I. Effect of bleaching agents on dentin permeability to *Streptococcus faecalis*. *J Endod.* 1995;21(11):540-2.

Hirata R, Kiyon NZ, Miller J. Clareamento de dentes vitalizados: situação clínica atual. *J Brás. Odontol. Clin.* 1997;1(1):13-21.

Howell RA. Bleaching discoloured root-filled teeth. *Br Dent J.* 1980;148(6):159-62.

International Agency on Research on Cancer. Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Re-evaluation of some organic chemicals, hydrazine and hydrogen peroxide. Lyon, France; 1999.

Jafarnia B, Jiang J, He J, Wang YH, Safavi KE, Zhu Q. Evaluation of cytotoxicity of MTA employing various additives. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2009;107(5):739-44.

Kehoe JC. pH reversal following in vitro bleaching of pulpless teeth. *J Endod.* 1987;13(1):6-9.

Kim E, Jeon IS, Kim JW, Kim J, Jung HS, Lee SJ. An MTT based method for quantification of periodontal ligament cell viability. *Oral Diseases.* 2007;13(5):495-499.

Kinomoto Y, Carnes DL Jr, Ebisu S. Cytotoxicity of intracanal bleaching agents on periodontal ligament cells in vitro. *J Endod.* 2001;27(9):574-7.

Koulaouzidou E, Lambrianidis T, Konstantinidis A, Kortsaris AH. In vitro evaluation of the cytotoxicity of a bleaching agent. *Endod Dent Traumatol.* 1998;14(1):21-5.

Laroui P, Desai SD, Li TK, Liu AA, Liu LF. Hydrogen peroxide induces topoisomerase 1-mediated DNA damage and cell death. *J Biol Chem.* 2004; 279:14587-14594.

Lee GP, Lee MY, Lum SO, Poh RS, Lim KC. Extraradicular diffusion of hydrogen peroxide and pH changes associated with intracoronary bleaching of discoloured teeth using different bleaching agents. *Int Endod J.* 2004;37(7):500-6.

Leonardo MR. *Endodontia: tratamento de canais radiculares: princípios técnicos e biológicos* – São Paulo: Artes Médicas; 2005. 1491p.

Li Y. Biological properties of peroxidecontaining tooth whiteners. *Food and Chemical Toxicology.* 1996; 34(5): 887-904.

Lim MY, Lum SO, Poh RS, Lee GP, Lim KC. An in vitro comparison of the bleaching efficacy of 35% carbamide peroxide with established intracoronary bleaching agents. *Int Endod J.* 2004;37(7):483-8.

Lima AF, Lessa FC, Gasparoto Mancini MN, Hebling J, de Souza Costa CA, Marchi GM. Cytotoxic effects of different concentrations of a carbamide peroxide bleaching gel on odontoblast-like cells MDPC-23. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2009;90(2):907-12.

Matis BA, Moura HN, Cochran MA, Eckert GJ. Clinical evaluation of bleaching agents of different concentrations. *Quintessence Int,* 2000;31(5):303-10.

Nathanson D. Vital tooth bleaching: sensitivity and pulpal considerations. *J Am Dent Assoc.* 1997;128 (Suppl):41S-44S.

Neuvald L, Consolaro A. Cementoenamel junction: microscopic analysis and external cervical resorption. *J Endod.* 2000;26(9):503-8.

Nutting EB, Poe GS. A new combination for bleaching teeth. *J So CA Dent Assoc.* 1963;31(1):289-291.

Oliveira DP, Teixeira EC, Ferraz CC, Teixeira FB. Effect of intracoronal bleaching agents on dentin microhardness. *J Endod.* 2007;33(4):460-2.

Oliveira LD, Carvalho CA, Hilgert E, Bondioli IR, de Araújo MA, Valera MC. Sealing evaluation of the cervical base in intracoronal bleaching. *Dent Traumatol.* 2003;19(6):309-13.

Palo RM. Penetração de peróxido da câmara pulpar para a superfície radicular externa após clareamento interno [dissertação]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista; 2005.

Ramp WK, Arnold RR, Russell JE, Yancey JM. Hydrogen peroxide inhibits glucose metabolism and collagen synthesis in bone. *J Periodontol.* 1987;58(5):340-4.

Ribeiro DA, Marques ME, Salvadori DM. Assesment of genetic damage induced by dental bleaching agents on mouse lymphoma cells by using single cell gel (comet) assay. *J Oral Rehabil.* 2005;32(10):766-71.

Robertson WD, Melfi RC. Pulpal response to vital bleaching procedures. *J Endod.* 1980;6(7):645-9.

Rotstein I, Dankner E, Goldman A, Heling I, Stabholz A, Zalkind M. Histochemical analysis of dental hard tissues following bleaching. *J Endod.* 1996;22(1): 23-26.

Rotstein I, Lehr Z, Gedalia I. Effect of bleaching agents on inorganic components of human dentin and cementum. *J Endod.* 1992;18(6):290-3.

Rotstein I, Torek Y, Misgav R. Effect of cementum defects on radicular penetration of 30% H₂O₂ during intracoronar bleaching. *J Endod.* 1991;17(5):230-3.

Rotstein I. In vitro determination and quantification of 30% hydrogen peroxide penetration through dentin and cementum during bleaching. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1991;72(5):602-6.

Saleh AA, Ettman WM. Effect of endodontic irrigation solutions on microhardness of root canal dentine. *J Dent.* 1999;27(1):43-6.

Schmalz G. Use of cell cultures for toxicity testing of dental materials--advantages and limitations. *J Dent.* 1994;22(Suppl 2):S6-11.

Simon RH, Scoggin CH, Patterson D. Hydrogen peroxide causes the fatal injury to human fibroblast exposed to oxygen radicals. *J Biol Chem.* 1981;256(14):7181-6.

Slupphaug G, Kavli B, Krokan HE. The interacting pathways for prevention and repair of oxidative DNA damage. *Mutat res.* 2003;531(1-2):231-51.

Souza-Zaroni WC, Lopes EB, Ciccone-Nogueira JC, Silva RC. Clinical comparison between the bleaching efficacy of 37% peroxide carbamide gel mixed with sodium perborate with established intracoronar bleaching agent. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2009;107(2):43-7.

Spasser HF. A simple bleaching technique using sodium perborate. NY State Dent J. 1961;27:332-334.

Tipton DA, Braxton SD, Dabbous MK. Effects of a bleaching agent on human gingival fibroblasts. J Periodontol. 1995;66(1):7-13.

Truman J. Bleaching of non-vital discoloured anterior teeth. Dent Times. 1964;1(3):68-72.

Weiger R, Kuhn A, Löst C. Radicular penetration of hydrogen peroxide during intra-coronal bleaching with various forms of sodium perborate. Int Endod J. 1994;27(6):313-7.

ANEXO A – Certificado do comitê de ética em pesquisa



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE SÃO JOSÉ DOS CAMPOS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

Av. Eng. Francisco José Longo, 777 – Jd. São Dimas
CEP 12201-970 – F. (12) 3947-9028
Fax (12) 3947-9010 / janeto@fojoc.unesp.br



CERTIFICADO
Comitê de Ética em Pesquisa
Envolvendo Seres Humanos

CERTIFICAMOS, que o protocolo nº **024/2009-PH/CEP**, sobre **“Avaliação da citotoxicidade de agentes clareadores internos sobre fibroblastos periodontais”**, sob a responsabilidade de **ALETÉIA MASSULA DE MELO FERNANDES**, tendo como orientadora a Profa. Adjunto Márcia Carneiro Valera de Moraes, está de acordo com os Princípios Éticos, seguindo diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisa, envolvendo seres humanos, conforme Resolução nº 196/96 do Conselho Nacional de Saúde e foi aprovado por este Comitê de Ética em Pesquisa.

São José dos Campos, 12 de maio de 2009.



Profa. Adjunto JANETE DIAS ALMEIDA
Coordenadora

Fernandes AMM. Evaluation of the cytotoxicity of intracanal bleaching agents in human gingival fibroblasts [dissertation]. São José dos Campos: School of Dentistry of São José dos Campos, UNESP – São Paulo State University; 2009.

ABSTRACT

The propose of this study was to evaluate the cytotoxicity from five bleaching agents, used for the technique of intracanal bleaching, on human gingival fibroblasts (FMM1). The cells were cultivated in DMEM and when they were presented in enough amount and between the fifth and tenth passages they were placed in plates of 96 wells; where they received the conditional culture according to the experimental groups (n=12): G1- SP + H₂O; G2- SP + CP20%; G3- CP20%; G4- SP + HP35%; G5- HP35%. The control group (n=12) corresponded to the curve of cell growth and viability, where the cells didn't receive any treatment. The MTT assay was carried through in the periods of 24 and 48 hours to evaluate the cellular viability. The amount of set free hydrogen peroxide in the experimental conditions was also measured in a spectrophotometer. The data were submitted to statistical analysis of variance and Turkey's test. All the experimental groups presented significant difference in comparison to the control. The evaluation time showed statistical difference, except for the G1 (SP + H₂O). Conclusion: all the bleaching agents had showed cytotoxicity effects, reducing significantly the cell metabolism and viability; the association of sodium perborate with distilled water was the most toxic bleaching agent and carbamide peroxide 20% the least.

KEYWORDS: Bleaching Agents. Cell Culture. Cytotoxicity. Gingival Fibroblasts.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)