

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Programa de Pós-Graduação em Odontologia



Dissertação

**Citotoxicidade e genotoxicidade do percarbonato de sódio:
comparação com agentes clareadores comumente utilizados
no tratamento de dentes despulpados.**

MARÍA RAQUEL FERNÁNDEZ MORÍNIGO

Pelotas 2009

MARÍA RAQUEL FERNÁNDEZ MORÍNIGO

Citotoxicidade e genotoxicidade do percarbonato de sódio: comparação com agentes clareadores comumente utilizados no tratamento de dentes despolpados.

DISSERTAÇÃO apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Odontologia da UNIVERSIDADE
FEDERAL DE PELOTAS como requisito
parcial à obtenção do título de Mestre em
Odontologia, Área de concentração em
Dentística.

Orientadora: Profa. Dra. Márcia Bueno Pinto

Co-orientadores: Profa. Dra. Adriana Etges

Dr. Rodrigo Varella de Carvalho

Pelotas, 2009

Banca examinadora:

Profa. Dra. Fátima Alves Beira

Prof. Dr. Flávio Fernando Demarco

Profa. Dra. Márcia Bueno Pinto

Profa. Dra. Adriana Fernandes da Silva (suplente)

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais

Rubén e María Teresa, aos meus irmãos Fabio e Verónica e aos meus
sobrinhos queridos Vania, Celina, Patricio e Laura.

Vocês foram a força e o incentivo para que eu chegasse até aqui. Eu não
seria a pessoa que sou sem o amor e o apoio de vocês.

Amo vocês!

*Porque tu amor me guarda siempre,
atravieso contigo las tinieblas y la
noche.*

J.K

AGRADECIMENTOS ESPECIAS

Agradeço a Deus, minha fonte estimuladora por sempre ter caminhado do meu lado, por ter me segurado e confortado. “Nos pertencemos mutuamente”. J.K

Ao meu namorado Rodrigo, pelo amor e apoio incondicional. Amore, obrigada por tudo! Essa experiência de vida foi muito mais rica contigo do meu lado. Certamente, uma parte desta conquista te pertence!

A minha amiga, parceira e dupla Silvia, pelos tantos momentos compartilhados, pela amizade e pela companhia constante. Muito temos aprendido juntas. Foi um presente ter te conhecido!

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Professora Doutora Márcia Bueno Pinto, que cordialmente me aceitou como orientada. Muito obrigada pela paciência e disponibilidade.

A minha co-orientadora Professora Doutora Adriana Etges. Seus ensinamentos foram de grande valia no desenvolvimento deste projeto. Muito obrigada pela ajuda e atenção.

Ao Professor Doutor Flávio Fernando Demarco, pelo exemplo de profissionalismo. Um verdadeiro incentivador de alunos! Obrigada pelo estímulo e pela confiança. Foi um enorme prazer tê-lo conhecido.

Ao colega e doutorando Fabrício Aulo Ogliari, co-autor desse trabalho, pela ajuda nos projetos realizados.

Ao Professor Doutor Evandro Piva, quem na frente do PPGO me abriu as portas da UFPel. Muito obrigada pela oportunidade e a acolhida!

Ao Programa de Estudantes de Convênio (PEC-PG) e ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) por conceder minha bolsa de estudos.

À minha amiga e colega Giana e família, por ter me acolhido com tanto carinho na minha chegada em Pelotas. Obrigada pela paciência e disponibilidade de sempre. Você é uma grande amiga!

Às minhas amigas VIPS Renata, Sônia, Silvia, Paula, Glória e Nihad pela convivência, pela compreensão e, sobretudo pela amizade. Minha família pelotense! Meninas, vocês fizeram da minha vida aqui muito mais feliz. Não tem distância que nos separe!

Ao meu colega Thiago, pela amizade e parceria nos trabalhos realizados. Foi muito bom trabalhar com você.

Aos meus colegas e amigos do Mestrado e Doutorado em Dentística e Odontopediatria Thiago, Marcos, Silvia, Sandrina, Paula, Glória, Márcio, Marcus, Carol, Françoise, Marina, Marília, Tiago, Tino, Fabrício, Giana, Luciano, Neno, Lund, Sônia e Renata, pelo que aprendi com vocês nas reuniões de sexta-feira e pela convivência.

À aluna de graduação Cari Pieper pela ajuda e dedicação nos trabalhos executados.

À secretária do Programa de Pós-Graduação em Odontologia Josiane Silva.

Aos técnicos do Laboratório CDC - Bio e do CDDB pela ajuda e disposição.

NOTA PRELIMINAR

Essa Dissertação foi redigida de acordo com o Manual de Normas para Dissertações, Teses e Trabalhos Científicos da Universidade Federal de Pelotas de 2006, adotando o Nível de Descrição 4 – Estruturas em Artigos, que consta no Apêndice D do referido manual. O trabalho descrito nessa Dissertação deu origem a um manuscrito intitulado “*Cytotoxicity and genotoxicity of sodium percarbonate: a comparison with bleaching agents commonly used to discolored pulpless teeth*” que foi submetido e aceito para publicação no periódico intitulado *International Endodontic Journal*. Portanto, neste documento o mesmo está apresentado em língua inglesa no apêndice de acordo com as normas do periódico ao qual foi submetido para publicação. Adicionalmente, também será apresentada uma versão do documento em língua portuguesa, facilitando assim a compreensão da presente Dissertação.

RESUMO

FERNÁNDEZ, María Raquel. **Citotoxicidade e genotoxicidade do percarbonato de sódio: comparação com agentes clareadores comumente utilizados no tratamento de dentes despolpados.** 2009. 61f. Dissertação de Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Objetivo Avaliar a citotoxicidade e genotoxicidade do percarbonato de sódio e comparar com os agentes clareadores comumente utilizados no tratamento de dentes despolpados em cultura celular.

Metodologia A citotoxicidade e genotoxicidade dos agentes clareadores foram avaliadas tanto na forma pura de cada produto quanto nas concentrações utilizadas na prática clínica. Peróxido de Hidrogênio (PH), peróxido de carbamida (PC), perborato de sódio (PS) e percarbonato de sódio (PCS) foram diluídos em DMEM. A viabilidade de fibroblastos da linhagem 3T3/NIH após 24 h de exposição aos diferentes agentes foi medida fotometricamente por meio do teste colorimétrico com MTT. A genotoxicidade foi indicada pela formação e contagem de micronúcleos (MN) analisados em microscópio óptico comum (400x). A análise estatística dos dados foi feita utilizando o teste ANOVA de uma via complementado com o teste de comparações múltiplas Tukey *post hoc* ($p < 0,005$).

Resultados Todos os grupos testados apresentaram um efeito citotóxico dose-dependente. Entretanto, o PC mostrou citotoxicidade semelhante ao grupo controle (GC). PH e PCS foram significativamente mais citotóxicos que PS. O teste de genotoxicidade mostrou que PCS e PS apresentaram uma frequência intermediária de MN quando comparados ao GC. Por outro lado, a frequência média de MN usando PH foi significativamente superior aos outros grupos testados ($p < 0,005$). Não houve diferença estatística entre PC e o GC.

Conclusão A citotoxicidade do PCS foi similar ao PH e significativamente maior do que o PS. Por outro lado, PCS e PS apresentaram um efeito genotóxico intermediário, inferior ao PH, porém superior ao PC que não teve efeito genotóxico.

Palavras chaves agentes clareadores, toxicidade, citotoxicidade, genotoxicidade, clareamento de dente.

SUMMARY

FERNÁNDEZ, María Raquel. **Cytotoxicity and genotoxicity of sodium percarbonate: a comparison with bleaching agents commonly used in discolored pulpless teeth.** 2009. 61f. Dissertação de Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Aim To evaluate the cytotoxicity and genotoxicity of sodium percarbonate in comparison with bleaching agents used in discolored pulpless teeth from a mouse fibroblast cell culture.

Methodology The bleaching agents cytotoxicity and genotoxicity were evaluated both in their pure form of products as well as in concentration commonly used in clinical practice. Hydrogen peroxide (HP), carbamide peroxide (CP), sodium perborate (SP) and sodium percarbonate (SPC) were diluted in DMEM in series. To evaluate the cytotoxicity, the survival of 3T3 mouse fibroblasts were measured photometrically by using MTT assay after a 24h exposure period. Genotoxicity was indicated by the micronuclei (MN) formation and the modification of the normal cell was analyzed by light microscopy (400x). The statistical analysis was performed by one-way ANOVA, followed by a multiple-comparison Tukey post hoc test ($p < 0.05$).

Results All tested groups exhibited a dose-dependent cytotoxicity. However, CP has showed a similar cytotoxic effect when compared with DMEM untreated control (UC) group. PH and SPC were significantly more cytotoxic than SP. Genotoxicity test has showed that SPC and SP have presented an intermediate rate of MN frequency over the UC group. The mean rate of MN frequency to ... was higher and statistically more significant than other groups tested. No difference was observed when CP and UC groups were compared.

Conclusions The results suggest that the cytotoxicity of SPC was similar to HP and significantly more cytotoxic than SP and CP. On the other hand, SPC and

SP has shown an intermediate genotoxic effect, lower than HP and higher than CP, which was non-genotoxic.

Keywords: genotoxicity test, toxicity test, cytotoxicity test, pulpless teeth, tooth bleaching

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Microfotografia representativa de fibroblastos de camundongos 3T3/NIH após 24 h de exposição aos agentes clareadores ilustrando (a) célula com visível formação de MN 24 e (b) célula com núcleo e citoplasma normais.....
- Figura 2** Efeito citotóxico dos agentes clareadores testados na forma pura após 24 h de exposição celular. Os valores de absorbância (média $\pm$ DP) nas cinco diluições (10 a 0,01 mM) de cada produto, comparados com o grupo controle foram obtidos. Comparações múltiplas entre os diferentes agentes clareadores também estão indicadas. Letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$)..... 25
- Figura 3** Efeito citotóxico dos agentes clareadores testados nas concentrações clínicas após 24 h de exposição celular. Os valores de absorbância (média $\pm$ DP) nas cinco diluições (1×10^{-1} a 1×10^{-5}) de cada produto, comparadas com o grupo controle foram obtidos. Comparações múltiplas entre os diferentes agentes clareadores também estão indicadas. Letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$)..... 26

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Diluições da forma pura dos agentes clareadores usadas no teste de citotoxicidade.....	20
Tabela 2	Diluições dos agentes clareadores testados nas concentrações clinicamente utilizadas.....	21
Tabela 3	Frequência de células micronucleadas (MN) por 1000 células após 24 h de exposição aos agentes clareadores (n = 3).....	27

LISTA DE SIMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

PH - peróxido de hidrogênio

PC - peróxido de carbamida

PS - perborato de sódio

PCS - percarbonato de sódio

DMEM - meio Essencial de Eagle Modificado por Dubelcco's

h – hora

MTT - brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazólio

MN – micronúcleos

x – vezes

< - menor

GC - grupo controle

mM - mili Molar

DP - desvio padrão

CEP - Comitê de Ética em Pesquisa

% - por cento

g – grama

mL – mililitro

μL – microlitro

SFB - soro fetal bovino

°C - graus Celsius

DMSO - dimetil sulfóxido

cm²- centímetro quadrado

nm - nanômetro

N – normal

s - segundos

SUMÁRIO

RESUMO

SUMMARY

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE SIGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	17
2	MATERIAIS E MÉTODOS.....	20
2.1	Reagentes.....	20
2.2	Diluição dos agentes clareadores.....	20
2.3	Cultura celular.....	21
2.4	Teste de citotoxocidade (Ensaio MTT).....	21
2.5	Teste de genotoxicidade (Contagem de Micronúcleos).....	22
2.6	Análise Estatística.....	24
3	RESULTADOS.....	25
4	DISCUSSÃO.....	28
5	CONCLUSÕES.....	33
	REFERÊNCIAS.....	34
	APÊNDICE A: Artigo aceito no <i>International Endodontic Journal</i>	38
	APÊNDICE B: Parecer do Comité de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Pelotas.....	60

1 INTRODUÇÃO

A aplicação de agentes oxidantes para contornar o problema estético decorrente da alteração da cor dos dentes, tornou o clareamento dental uma opção de tratamento simples, econômica e conservadora quando comparada restaurações do tipo faceta ou coroa total (Lim et al. 2004; Asfora et al. 2005; Joiner et al. 2008). As técnicas contemporâneas de clareamento para dentes despulpados utilizam como agente clareador o peróxido de hidrogênio (PH) ou algum precursor do mesmo, como o peróxido de carbamida (PC) e o perborato de sódio (PS), podendo ser utilizados de forma individual ou combinados (Attin et al. 2003; Farmer et al. 2006; Plotino et al. 2008). O PH, agente oxidante forte, é um veículo de íons e radicais de oxigênio, os quais devido a sua instabilidade e baixo peso molecular, são capazes de se difundir livremente pelo esmalte e dentina e promover a quebra de moléculas de pigmentos altamente conjugadas em moléculas menores, menos coloridas, e mais difusíveis (Kawamoto & Tsujimoto 2004; Joiner 2006; Goldberg et al. 2007).

Apesar de ser bem reconhecida a eficácia e segurança dos agentes clareadores (Joiner 2006; Mahony et al. 2006), até hoje são relatados alguns efeitos adversos envolvidos no clareamento de dentes despulpados (Kinomoto et al. 2001; Tredwin et al. 2006). Danos à mucosa e ligamento periodontal podem ocorrer se durante o tratamento clareador os produtos entram em contato direto com os tecidos bucais (Kinomoto et al. 2001; Dahl & Pallesen 2003; Plotino et al. 2008). No entanto, dependendo da intensidade os danos podem ser moderados e passageiros (Mahony et al. 2006; Meireles et al. 2008). A reabsorção cervical externa é descrita como outro possível efeito adverso após tratamento clareador interno (Friedman 1997; Dahl & Pallesen 2003). O

aumento da permeabilidade dos tecidos dentários após a aplicação de agentes clareadores facilita a difusão dos agentes oxidantes através dos túbulos dentinários podendo chegar até o periodonto e atingir os tecidos circundantes (Costa et al. 2000; Carrasco et al. 2003). Mesmo sabendo que a incidência de reabsorção cervical externa após tratamento clareador é baixa, autores relatam que a combinação de clareamento interno com altas concentrações de peróxidos e história de trauma, ortodontia ou cirurgia bucal, pode representar um fator predisponente para a reabsorção cervical externa (Heller et al. 1992; Baratieri et al. 1995; Heithersay 1999).

Sabe-se também, que as reações de radicais livres promovidas no tratamento clareador não são específicas apenas para moléculas pigmentadas dos dentes (Kawamoto & Tsujimoto 2004). Por tanto, as substâncias químicas reativas derivadas do PH, podem reagir com outras estruturas orgânicas e atuar como promotoras de injúrias, ou mesmo induzir danos oxidativos irreversíveis ao DNA (Ribeiro et al. 2005).

No entanto, um exame clínico meticuloso (Dahl & Pallesen 2003), complementado com um efetivo isolamento dos tecidos bucais e o uso de barreiras protetoras na entrada do canal radicular (ao redor da junção amelo-cementária) são procedimentos de rotina indispensáveis que permitem minimizar os efeitos adversos antes citados (Goldberg et al. 2007). Adicionalmente, com intenção de reduzir os potenciais danos oxidativos após o tratamento clareador, tem sido sugerido se limitar o uso de agentes oxidantes fortes como o PH em altas concentrações indicando o uso de produtos considerados mais seguros como ser o PS ou PC (Kinomoto et al. 2001; Goldberg et al. 2007).

Há alguns anos atrás, o percarbonato de sódio (PCS), composto amplamente utilizado como clareador nas formulações de detergentes e produtos de lavanderia foi descrito como outro agente liberador de PH passível de ser usado no clareamento de dentes despolpados (Kaneko et al. 2000). O mecanismo de ação do PCS parece ser similar ao PS, visto que quando dissolvido em água, o PCS se desdobra em carbonato de sódio e PH (Kaneko et al. 2000). Apesar de que ainda não existem disponíveis no comercio formulações incluindo o PCS para o tratamento de dentes despolpados, o PCS já pode ser encontrado atualmente em concentrações de 16 a 19% na composição de filmes de silicone para clareamento vital caseiro (Kim et al. 2004; Gokay et al. 2005; de A Silva et al. 2006). No entanto, até hoje não foram relatados na literatura estudos avaliando a segurança biológica do produto. Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar a citotoxicidade e genotoxicidade do PCS e comparar com os agentes clareadores comumente utilizados no tratamento clareador de dentes despolpados.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

O projeto de pesquisa do presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Pelotas com parecer favorável número 047/2008.

2.1 Reagentes

Os agentes clareadores testados foram: perborato de sódio (PS), percarbonato de sódio (PCS), peróxido de hidrogênio (PH) e peróxido de carbamida (PC). O PS e o PH foram adquiridos da empresa Synth (São Paulo, Brasil). O PC foi comprado da Vetec Química Fina Ltda (Rio de Janeiro, Brasil) enquanto o PCS foi adquirido da Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA). O meio de cultivo foi comprado da GIBCO (Grand Island, NY, USA). Todos os outros reagentes foram comprados da Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA).

2.2 Diluições dos agentes clareadores

Para a avaliação dos produtos na forma pura, cada agente clareador foi diluído em meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) em concentrações de 10 mM a 0.001 mM (Tabela 1).

Tabela 1 – Diluições da forma pura dos agentes clareadores usadas no teste de citotoxicidade.

Agentes clareadores	Diluição máxima (mM)	Diluição mínima (mM)	Formula Química
PH	0,001	10	H ₂ O ₂
PS	0,001	10	NaBo ₃
PC	0,001	10	CH ₆ N ₂ O ₃
PCS	0,001	10	2Na ₂ CO ₃ .3H ₂ O ₂

PH; peróxido de hidrogênio; PS, perborato de sódio; PC, peróxido de carbamida; PCS, percarbonato de sódio

Por outro lado, para testar os produtos nas concentrações comumente utilizadas na prática clínica, diluições seriadas de PC (37%), PS (2 g/mL água), PS (2 g/mL PH 35%), PCS (2 g/mL água) e PCS (2 g/mL PH 35%) de 10⁻¹ a 10⁻⁵ (Kinomoto et al. 2001) de DMEM foram preparadas (Tabela 2)

Tabela 2 – Diluições dos agentes clareadores nas concentrações clinicamente utilizadas.

Agentes clareadores	Diluição Máxima (%)	Diluição mínima (%)	Fórmula Química
PH 30%	10^{-5}	10^{-1}	H_2O_2
PS (2g/mL 30%PH)	10^{-5}	10^{-1}	$NaBO_3 + H_2O_2$
PS (2g/mL água)	10^{-5}	10^{-1}	$NaBO_3$
PC 37%	10^{-5}	10^{-1}	$CH_6N_2O_3$
PCS (2g/mL 30%HP)	10^{-5}	10^{-1}	$2Na_2CO_3 \cdot 3H_2O_2 + H_2O_2$
PS (2g/mL água)	10^{-5}	10^{-1}	$2Na_2CO_3 \cdot 3H_2O_2$

PH, peróxido de hidrogênio; PS, perborato de sódio; PC, peróxido de carbamida; PCS, percarbonato de sódio

2.3 Cultura celular

Uma linhagem celular imortalizada de fibroblastos de camundongo 3T3/NIH foi utilizada no estudo. O meio de cultura celular utilizado foi DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 2% L-glutamina, penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (100 mg/mL). Para a obtenção de um número igualitário de células por grupo foi feita a contagem celular numa câmara de Neubauer ou hematocitômetro. Em cada poço teste da placa de 96 poços foram colocados 2×10^4 células em 200 μ L de DMEM mais SFB. A placa foi incubada em uma estufa de CO_2 (Forma Scientific Inc. USA) com controle de temperatura e pressão, em ambiente úmido a $37^\circ C$, 95% de ar e 5% de CO_2 por 24 h de forma a permitir a adesão das células no fundo da placa de cultivo.

2.4 Teste de Citotoxicidade (Ensaio MTT)

A viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio colorimétrico MTT, que se baseia na capacidade das células viáveis reduzirem metabolicamente o MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazólio) por meio da enzima mitocondrial desidrogenase succínica formando um sal denominado formazan de cor azul-púrpura que se acumula no citoplasma celular. Uma vez que os agentes clareadores já dissolvidos foram adicionados nos poços testes, a placa foi incubada ($37^\circ C$, 5% de CO_2) por período de 24 h permitindo que os produtos atuassem na monocamada celular.

Após 24 h, o meio com os produtos testes de cada poço foi sugado. Foram preparados 2mL de solução de MTT que foram adicionados a cada poço teste (20 μ L por poço) e incubados novamente por 24 h de forma a permitir o metabolismo do MTT. Passado o período, o meio foi sugado e o formazan ressuspendido em 200 μ L de dimetil sulfóxido (DMSO).

Os resultados das densidades ópticas foram obtidos em um espectrofotômetro (Thermo Multiskan EX, Thermo Fisher Scientific, Inc, Waltham, MA) com um comprimento de onda de 540 nm, onde foram considerados os valores de absorbância como indicador da viabilidade celular.

2.5 Teste de genotoxicidade (Contagem de Micronúcleos)

Os fibroblastos utilizados no teste de genotoxicidade cresceram em subconfluência em garrafas de cultivo de 25 cm² nas condições descritas anteriormente. As células foram cultivadas por 5 dias antes de serem expostas aos agentes clareadores com o objetivo de atingir crescimento exponencial das mesmas. Logo após, as mesmas foram separadas da garrafa de cultivo com ajuda de 0,15% de tripsina em contato com as células por 5 minutos a temperatura ambiente. Após, foram acrescentados 5 mL de meio e soro para logo ser realizada a distribuição de 5×10^5 células para cada garrafa teste. Para cada grupo experimental 0,1 mM de agente clareador na forma pura foi diluído em DMEM e acrescentados em cada garrafa de cultivo. Tendo em consideração que os MN só podem ser encontrados em células com capacidade de divisão, foi escolhida uma diluição de 0,01 mM. Assim, apesar de ser observado um efeito citotóxico dos agentes clareadores nessa diluição, um número adequado de células permaneceu viável para a realização da contagem de MN. Após 24h de contato com os agentes clareadores, as células

foram novamente separadas com tripsina da garrafa de cultivo. Para inativar a tripsina uma solução de meio e soro foi utilizada e as células foram centrifugadas 1.500 rpm por 5 min. Então, as células de cada grupo foram ressuspensas e fixadas em lâminas de vidro em solução de metanol e ácido acético 3:1.

Posteriormente as lâminas foram coradas pela Técnica Feulgen. Esta consiste na lise das células através da oxidação em solução de ácido clorídrico 1N e posterior coloração com reagente de Schiff e corante Fast Green. Para isso, cada lâmina foi imersa três vezes em solução de ácido clorídrico 1N e seguidamente lavadas em água destilada por duas vezes.

Depois de secas, as lâminas foram coradas com o reagente de Schiff, ficando imersas no corante por um período de 2 horas e 30 minutos a temperatura ambiente, em ambiente escuro. Logo após, o reagente foi removido e as lâminas foram cobertas por água tamponada por 1 minuto. Seguidamente, foi realizada uma última lavagem em água destilada para logo serem secas por um período de 24 h. No dia seguinte, cada lâmina foi imersa no corante Fast Green por 10 segundos e lavadas por três vezes em álcool 96° GL por 10 segundos cada.

Os micronúcleos foram visualizados em microscópio óptico comum (Olympus CX2, Olympus Optical do Brasil Ltda., São Paulo, Brasil), com objetiva de 40x e oculares de 10x. Antes de iniciar a contagem de MN, cada lâmina foi codificada para propiciar a avaliação imparcial do observador. Um total de 3.000 células por grupo foi observado, sendo que a frequência de MN foi observada a cada 1.000 células. Foram contadas duas lâminas para cada grupo. Os critérios utilizados para a identificação de MN foram os mesmos

descritos por Countryman e Heddle em 1976, que afirmam que os micronúcleos devem apresentar um contorno regular redondo u ovais e estar dentro do citoplasma da célula, estar no mesmo plano focal e apresentar uma cor semelhante ao núcleo principal, ter um diâmetro menor que 1/3 do diâmetro do núcleo principal e se encontrar marginal ou justaposto ao núcleo principal (Countryman & Heddle 1976) (Figura 1).

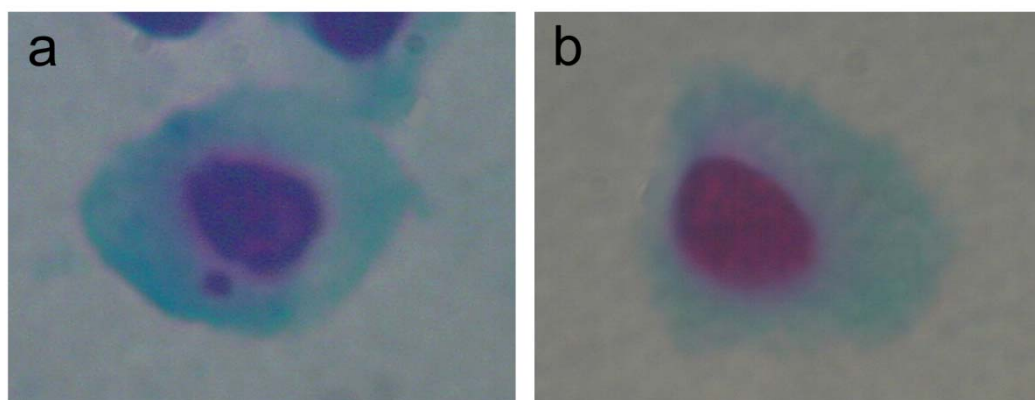


Figura 1. Microfotografia representativa de fibroblastos de camundongos 3T3/NH1 após 24 h de exposição aos agentes clareadores ilustrando (a) uma célula com núcleo e citoplasma normais e (b) célula com visível formação de MN.

2.6 Análise estatística

De acordo com os resultados obtidos nos testes de citotoxicidade e genotoxicidade, a análise estatística dos dados foi feita utilizando o teste ANOVA de uma via complementado com o teste de comparações múltiplas Tukey post hoc considerando o valor de $p < 0,005$ como estatisticamente significativo.

3 RESULTADOS

A citotoxicidade provocada pelos agentes clareadores testados na forma pura após 24 h de contato com as células está representada na Figura 1. Todos os grupos testados exibiram um efeito citotóxico dose-dependente demonstrado pela redução nos valores de absorbância (menor número de células viáveis), exceto o PC que se mostrou similar ao GC ($p < 0,05$). Nas mais altas concentrações testadas (10 e 1,0 mM) foram possíveis observar que o PH, PCS e PS foram significativamente mais citotóxicos que o PC (Figura 1). Entretanto, também pode ser observado na Figura 1 que na concentração de 1.0 mM PCS e PH apresentaram um efeito citotóxico superior ao os demais grupos testados (Figura 2).

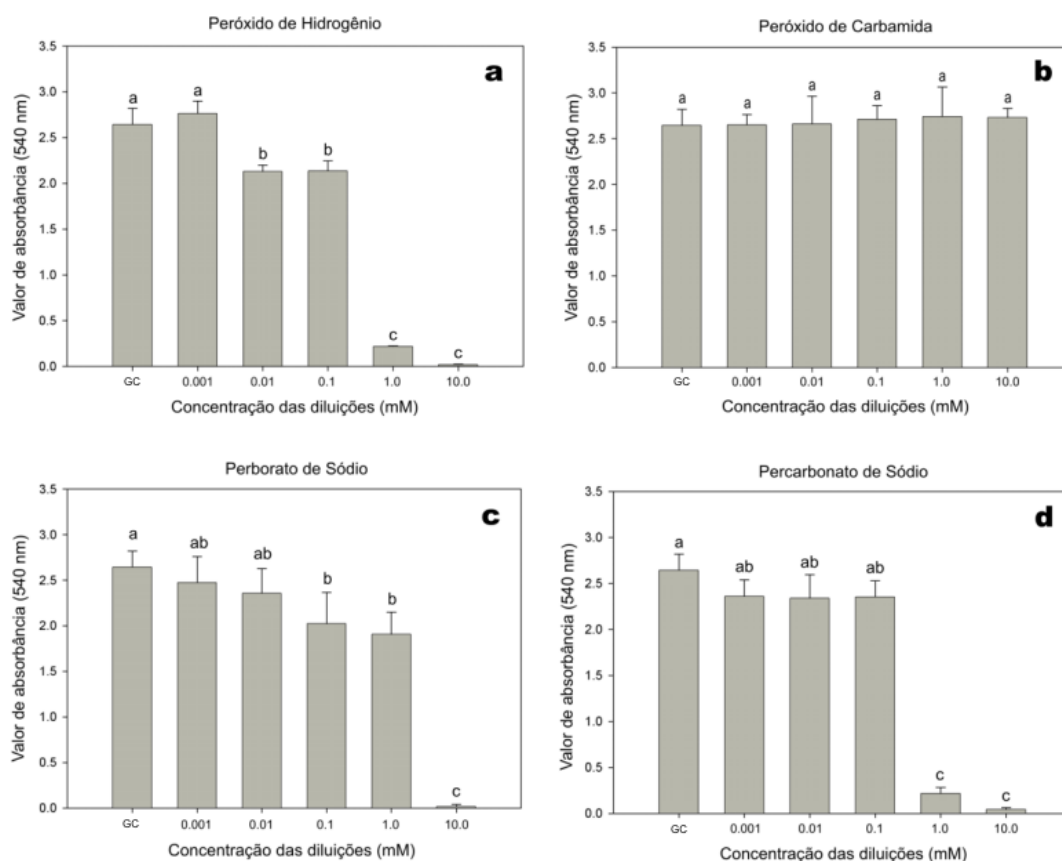


Figura 2. Efeito citotóxico de agentes clareadores testados na forma pura do produto após 24h de exposição celular. O percentual de absorbância nas cinco diluições (10 a 0,01 mM) de cada produto, comparadas com o grupo controle foi calculada. Comparações múltiplas entre os diferentes agentes clareadores também estão indicadas. Resultados representados por média de absorbância $\pm$ DP. Letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$)

Quando os agentes clareadores foram avaliados nas concentrações comumente usadas clinicamente, a maior citotoxicidade foi observada para o PH (30%), PCS (2g/mL 30% PH), PS (2g/mL 30% PH) e PCS (2g/mL água); seguidos por PS (2g/mL água) e finalmente pelo PC 37% que novamente exibiu o menor efeito citotóxico em comparação ao GC (Figura 3).

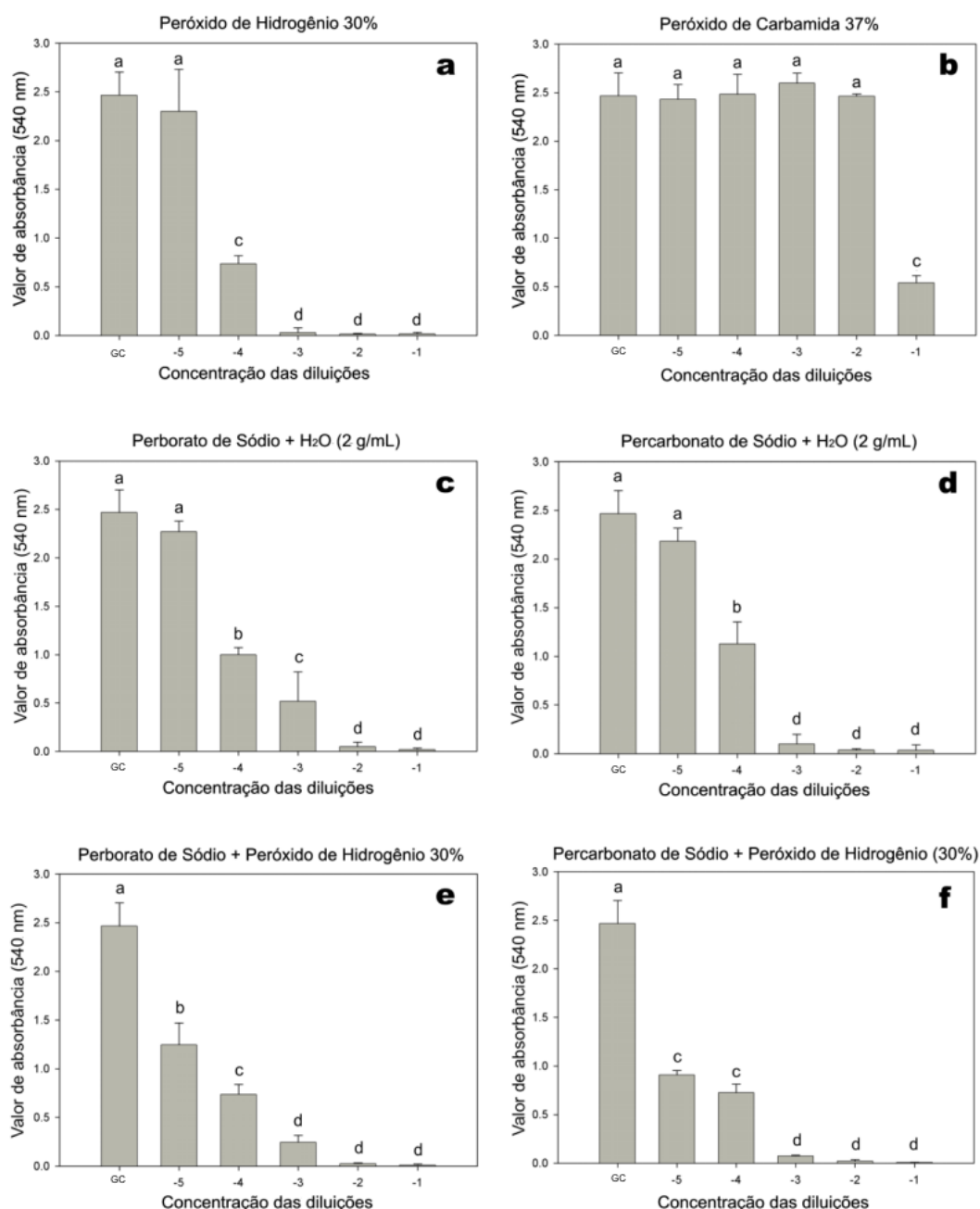


Figura 3. Efeito citotóxico dos agentes clareadores testados nas concentrações clínicas após 24h de exposição celular. O percentual de absorvância nas cinco diluições (1×10^{-1} a 1×10^{-5}) de cada produto, comparadas com o grupo controle foi calculada. Comparações múltiplas entre os diferentes agentes clareadores também estão indicadas. Resultados representados por média de absorvância $\pm$ DP. Letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$)

Os resultados do teste de genotoxicidade são descritos na Tabela 3. Uma comparação entre a frequência de micronúcleos (MN) encontrados após 24 h de exposição das células aos agentes clareadores foi realizada. PCS e PS apresentaram frequência intermédia de MN em relação ao GC ($p < 0,05$). A frequência média de MN para o PH foi superior ($22,33 \pm 2,08$) e estatisticamente significativa aos outros grupos. Não houve diferença estatística quando comparados o PC ($7,67 \pm 2,08$) e o GC ($7,00 \pm 1,00$).

Tabela 3 Frequência de células micronucleadas por 1000 células após 24 h de exposição celular (n = 3)

Grupos teste	Média	Desvio padrão ($\pm$ DP)
Péroxido de hidrogênio	22,33	$\pm 2,08$
Perborato de sódio	17,00	$\pm 1,00$
Percarbonato de sódio	16,00	$\pm 1,02$
Grupo controle (DMEM)	7,00	$\pm 1,00$

Letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$). DMEM: meio de Eagle modificado por Dulbecco's

4. DISCUSSÃO

Comumente, para assegurar a eficácia e segurança dos materiais utilizados como agentes clareadores, os produtos são avaliados em relação a sua habilidade e rapidez em devolver a cor natural de dentes escurecidos, também sobre o potencial de produzir danos às estruturas bucais adjacentes (Carrasco et al. 2003). Assim, este estudo buscou avaliar a citotoxicidade e genotoxicidade do percarbonato de sódio (PCS) em comparação a outros agentes clareadores já estabelecidos para o tratamento de dentes despolpados.

Testes de citotoxicidade e genotoxicidade em cultura de células são considerados ferramentas iniciais na caracterização dos biomateriais utilizados rotineiramente na prática clínica (Freshney 2001). Os testes de citotoxicidade são ensaios muito utilizados para a investigação do potencial tóxico de uma determinada substância já que conseguem controlar as condições físico-químicas e fisiológicas do ambiente de estudo, reduzem a experimentação animal, são econômicos, controláveis e reproduzíveis. (Schmalz 1994; Freshney 2001). Neste estudo, para testar os agentes clareadores foi utilizada uma linhagem imortalizada de fibroblastos de camundongos 3T3/NHI por ser uma linhagem celular acessível e bem caracterizada (Schmalz 1994).

Quando avaliados os produtos na forma pura, após 24 h de exposição celular foi possível observar que PH, PS e PCS em todas as diluições testadas (10 a 0,001 mM) mostraram uma diminuição na atividade metabólica das células em relação ao grupo controle (GC) (Figura 1a, 1c e 1d). De acordo com isso, *Hanks et al* em 1993 encontraram uma redução da atividade da enzima desidrogenase succínica após a aplicação de diluições seriadas de PH em

uma monocamada de células em cultura. Adicionalmente, *Kinomoto et al* em 2001, relataram que o PS, considerado um agente clareador relativamente seguro, apresentou efeito citotóxico quando em contato com células do ligamento periodontal. Só o PC não mostrou efeito citotóxico algum nas diluições testadas neste estudo (Figura 1b). Dado que concorda com *Wovelton et al* que em 1993, em um estudo *in vitro* concluíram que o PC se mostrou menos citotóxico que outros sete agentes clareadores testados. Estes resultados podem ser explicados pelo fato de que o PC é um precursor de uréia e PH, o que faz com que somente uma pequena proporção de PH (aproximadamente 30-35%) seja liberada do produto total (Joiner 2006; Goldberg et al. 2007).

A citotoxicidade dos agentes clareadores nas concentrações comumente utilizadas na prática clínica também foi avaliada. Uma baixa toxicidade do PC foi confirmada. Porém, discordando de *Aren et al* quem em 2003 encontraram valores de 60% na taxa de viabilidade celular para o PH (35%) e de 35% para o PC (20%) quando testados em cultura de células FM3A. O efeito citotóxico do PS (2g/mL água) foi intermediário quando comparado com os outros produtos testados. No entanto, a mistura do PS com 30% de PH (2g/mL) mostrou um efeito citotóxico significativamente superior ao produzido pelo produto diluído em água. Nesse contexto, *Kinomoto et al* em 2001 também demonstraram que o PH 30% testado individualmente ou em combinação com o PS se apresentou mais tóxico para as células de ligamento periodontal do que o PS (2g/mL água). Esses dados são importantes, visto que estudos têm demonstrado eficácia similar no tratamento clareador tanto para o PS (2g/mL em água) quanto para o PS misturado com PH de 3% a 30% (Rotstein et al. 1993; Ari &

Ungor 2002), o que sugere que na maioria dos casos poderia não ser necessária a combinação destes produtos para atingir o efeito clareador desejável.

Kaneko *et al* em 2000, sugeriram o PCS como um agente liberador de oxigênio alternativo para o tratamento de dentes despolpados. De fato, em um estudo *in vitro* os autores reportaram que soluções de PCS em água ou em 30% de PH tiveram um efeito clareador satisfatório no tratamento de dentes despolpados escurecidos artificialmente. Mesmo sendo de natureza química similar do PS, o PCS em todas as formas testadas foi significativamente mais citotóxico do que o PS (2g/mL água) e semelhante ao PH (30%). Baseado nos resultados obtidos nesse estudo pode ser sugerido que em solução o PCS poderia liberar uma proporção significativamente de peróxidos. Dessa forma, essas moléculas em contato com as células em cultura seriam responsáveis do efeito citotóxico mais expressivo em relação ao PS. Entretanto, para confirmar essa hipótese outros estudos mais específicos deveriam ser realizados.

Por outro lado, a interação dos radicais livres com as células em nível molecular pode ser responsável por um grande número de reações teciduais, denaturação protéica ou mesmo induzir danos oxidativos ao DNA (Dahl & Pallesen 2003; Attin *et al.* 2004; Asfora *et al.* 2005). Nesse contexto, a indução de micronúcleos (MN) é considerada um efetivo indicador biológico de danos citogenéticos em tecidos e processos associados a danos no DNA (Fenech *et al.* 1999; Ramirez & Saldanha 2002). Os MN são considerados massas de DNA com aparência de um pequeno núcleo situado no citoplasma de células que possuem capacidade de divisão (de Almeida *et al.* 2004). Assim, a frequência de MN indica a capacidade que possui uma substância para atingir tecidos e

ativar procarcinógenos em espécies reativas (Fenech et al. 1999; Bloching et al. 2000).

No presente estudo, os resultados indicam claramente que os agentes clareadores testados contribuíram com a incidência de danos ao DNA pelo aumento na frequência de MN após 24 h de exposição celular. O PCS assim como o PS exibiu uma frequência média de MN intermediária aos outros grupos testados. Já o PC, não mostrou diferença estatística quando comparado com o GC, enquanto o PH apresentou o maior efeito genotóxico. Nesse sentido, tem sido relatado o potencial do PH como produto ativo dos agentes clareadores em aumentar o risco de câncer oral, particularmente em populações susceptíveis, como fumantes e consumidores de álcool (Ribeiro et al. 2005). No entanto, as evidências mais fortes demonstram que o PH na forma e proporções utilizadas no tratamento clareador não pode ser considerado carcinogênico (Mahony et al. 2006).

Resumindo o relatado anteriormente, neste estudo foi possível observar uma correlação entre o potencial genotóxico e citotóxico dos produtos testados. Entretanto, é importante ressaltar que situações clínicas podem apresentar resultados diferentes. De fato, a toxicidade do PH pode ser significativamente reduzida quando nos testes em cultura celular são adicionadas enzimas como as catalases ou peroxidases (Dahl & Pallesen 2003). O que pode ser explicado pelo fato de que o PH representa um metabólito normal das células humanas aeróbicas (Attin et al. 2004; Goldberg et al. 2007). Assim, mecanismos enzimáticos endógenos do organismo humano provêm a proteção contra o potencial tóxico do PH, decompondo o produto em água e oxigênio (Attin et al. 2004; Mahony et al. 2006). Dessa forma, os resultados obtidos nesse estudo *in*

vitro pretendem fornecer as respostas iniciais sobre o desempenho biológico dos agentes clareadores testados, porém sem serem extrapolados para situações *in vivo*

5 CONCLUSÃO

Os resultados sugerem que o PCS teve um efeito citotóxico semelhante ao PH e significativamente superior ao PS e PC. PCS e PS apresentaram um efeito genotóxico intermediário, inferior ao PH, porém superior ao PC que não teve efeito genotóxico. No entanto, tratando-se de um estudo *in vitro*, os resultados devem ser analisados cuidadosamente, chamando sempre a atenção para a necessidade de estudos que visem avaliar o efeito *in vivo* dos materiais.

REFERÊNCIAS

AREN, G. In vitro effects of bleaching agents on FM3A cell line. **Quintessence International**, v. 34, n. 5, p. 361-365, 2003.

ARI, H.; UNGOR, M. In vitro comparison of different types of sodium perborate used for intracoronar bleaching of discoloured teeth. **International Endodontic Journal**, v. 35, n. 5, p. 433-436, 2002.

ASFORA, K. K.; SANTOS MDO, C.; MONTES, M. A.; DE CASTRO, C. M. Evaluation of biocompatibility of sodium perborate and 30% hydrogen peroxide using the analysis of the adherence capacity and morphology of macrophages. **Journal of Dentistry**, v. 33, n. 2, p. 155-162, 2005.

ATTIN, T.; HANNIG, C.; WIEGAND, A.; ATTIN, R. Effect of bleaching on restorative materials and restorations--a systematic review. **Dental Materials**, v. 20, n. 9, p. 852-861, 2004.

ATTIN, T.; PAQUE, F.; AJAM, F.; LENNON, A. M. Review of the current status of tooth whitening with the walking bleach technique. **International Endodontic Journal**, v. 36, n. 5, p. 313-329, 2003.

BARATIERI, L. N.; RITTER, A. V.; MONTEIRO, S. JR.; CALDEIRA DE ANDRADA, M. A.; CARDOSO VIEIRA, L. C. Nonvital tooth bleaching: guidelines for the clinician. **Quintessence International**, v. 26, n. 9, p. 597-608, 1995

BLOCHING, M.; HOFMANN, A.; LAUTENSCHLAGER, C.; BERGHAUS, A.; GRUMMT, T. Exfoliative cytology of normal buccal mucosa to predict the relative risk of cancer in the upper aerodigestive tract using the MN-assay. **Oral Oncology**, v. 36, n. 6, p. 550-555, 2000.

CARRASCO, L. D.; FRONER, I. C.; CORONA, S. A.; PECORA, J. D. Effect of internal bleaching agents on dentinal permeability of non-vital teeth: quantitative assessment. **Dental Traumatology**, v. 19, n. 2, p. 85-89, 2003.

COSTA, C. A.; MESAS, A. N.; HEBLING, J. Pulp response to direct capping with an adhesive system. **American Journal of Dentistry**, v. 13, n. 2, p. 81-87, 2000.

COUNTRYMAN, P. I.; HEDDLE, J. A. The production of micronuclei from chromosome aberrations in irradiated cultures of human lymphocytes. **Mutation Research**, v. 41, n. 2-3, p. 321-332, 1976.

DAHL, J. E.; PALLESEN, U. Tooth bleaching--a critical review of the biological aspects. **Critical Reviews in Oral Biology and Medicine**, v. 14, n. 4, p. 292-304, 2003.

DE ALMEIDA, T. M.; LEITAO, R. C.; ANDRADE J. D.; BECAK, W.; CARRILHO, F. J.; SONOHARA, S. Detection of micronuclei formation and nuclear

anomalies in regenerative nodules of human cirrhotic livers and relationship to hepatocellular carcinoma. **Cancer Genetics and Cytogenetics**, v. 150, n. 1, p. 16-21, 2004.

DA SILVA, M. F.; DAVIES, R. M.; STEWART, B. Effect of whitening gels on the surface roughness of restorative materials in situ. **Dental Materials**, v. 22, n. 10, p. 919-924, 2006.

FARMER, D. S.; BURCHAM, P.; MARIN, P. D. The ability of thiourea to scavenge hydrogen peroxide and hydroxyl radicals during the intra-coronal bleaching of bloodstained root-filled teeth. **Australian Dental Journal**, v. 51, n. 2, p. 146-152, 2006.

FENECH, M.; HOLLAND, N.; CHANG, W. P.; ZEIGER, E.; BONASSI, S. The Human MicroNucleus Project--An international collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans. **Mutation Research**, v. 428, n. 1-2, p. 271-283, 1999.

FRESHNEY, I. Application of cell cultures to toxicology. **Cell Biology and Toxicology**, v. 17, n. 4-5, p. 213-230, 2001.

FRIEDMAN, S. Internal bleaching: long-term outcomes and complications. **Journal of American Dental Association**, v. 128, Suppl. 51S-55S, 1997.

GOKAY, O.; MUJDECI, A.; ALGIN, E. In vitro peroxide penetration into the pulp chamber from newer bleaching products. **International Endodontic Journal** v. 38, n. 8, p. 516-520, 2005.

GOLDBERG, M.; BOHIN, F.; BONNET, E.; CLAISSE-CRINQUETTE, A.; DARTIGUES, J.; LOUIS, J. Tooth bleaching treatments - A Review. **ADF Medical Devices Commission**, p. 1-50, 2007.

HANKS, C. T.; FAT, J. C.; WATAHA, J. C.; CORCORAN, J. F. Cytotoxicity and dentin permeability of carbamide peroxide and hydrogen peroxide vital bleaching materials, in vitro. **Journal of Dental Research**, v. 72, n. 5, p. 931-938, 1993.

HEITHERSAY, G. S. Invasive cervical resorption: an analysis of potential predisposing factors. **Quintessence International**, v. 30, n. 2, p. 83-95, 1999.

HELLER, D.; SKRIBER, J.; LIN, L. M. Effect of intracoronary bleaching on external cervical root resorption. **Journal of Endodontics**, v. 18, n. 4, p. 145-148, 1992.

JOINER, A. The bleaching of teeth: a review of the literature. **Journal of Dentistry**, v. 34, n. 7, p. 412-419, 2006.

JOINER, A.; HOPKINSON, I.; DENG, Y.; WESTLAND, S. A review of tooth colour and whiteness. **Journal of Dentistry**, v. 36, Suppl. 1, S2-7, 2008.

KANEKO, J.; INOUE, S.; KAWAKAMI, S.; SANO, H. Bleaching effect of sodium percarbonate on discolored pulpless teeth in vitro. **Journal of Endodontics**, v. 26, n. 1, p. 25-28, 2000.

KAWAMOTO, K.; TSUJIMOTO, Y. Effects of the hydroxyl radical and hydrogen peroxide on tooth bleaching. **Journal of Endodontics**, v. 30, n. 1, p. 45-50, 2004.

KIM, J. H.; LEE, Y. K.; LIM, B. S.; RHEE, S. H.; YANG, H. C. Effect of tooth-whitening strips and films on changes in color and surface roughness of resin composites. **Clinical Oral Investigation**, v. 8, n. 3, p. 118-122, 2004.

KINOMOTO, Y. CARNES JR, D. L.; EBISU, S. Cytotoxicity of intracanal bleaching agents on periodontal ligament cells in vitro. **Journal of Endodontics**, v. 27, n. 9, p. 574-577, 2001.

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

MAHONY, C.; FELTER, S. P.; MCMILLAN, D. A. An exposure-based risk assessment approach to confirm the safety of hydrogen peroxide for use in home tooth bleaching. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 44, n. 2, p. 75-82, 2006.

MEIRELES, S. S.; DEMARCO, F. F.; DOS SANTOS, I. S.; DUMITH, S. C.; BONA, A. D. Validation and reliability of visual assessment with a shade guide for tooth-color classification. **Operative Dentistry**, v. 33, n. 2, p. 121-126, 2008.

PLOTINO, G.; BUONO, L.; GRANDE, N. M.; PAMEIJER, C. H.; SOMMA, F. Nonvital tooth bleaching: a review of the literature and clinical procedures. **Journal of Endodontics**, v. 34, n. 4, p. 394-407, 2008.

RAMIREZ, A.; SALDANHA, P. H. Micronucleus investigation of alcoholic patients with oral carcinomas. **Genetic Molecular Research**, v. 1, n. 3, p. 246-260, 2002.

RIBEIRO, D. A.; MARQUES, M. E.; SALVADORI, D. M. Assessment of genetic damage induced by dental bleaching agents on mouse lymphoma cells by single cell gel (comet) assay. **Journal of Oral Rehabilitation**, v. 32, n. 10, p. 766-771, 2005.

ROTSTEIN, I.; MOR, C.; FRIEDMAN, S. Prognosis of intracoronary bleaching with sodium perborate preparation in vitro: 1-year study. **Journal of Endodontics**, v. 19, n. 1, p. 10-12, 1993.

SCHMALZ, G. Use of cell cultures for toxicity testing of dental materials advantages and limitations. **Journal of Dentistry**, v. 22, Suppl 2, S6-11, 1994.

TREDWIN, C. J.; NAIK, S.; LEWIS, N. J.; SCULLY, C. Hydrogen peroxide tooth whitening (bleaching) products: review of adverse effects and safety issues. **British Dental Journal**, v. 200, n. 7, p. 371-376, 2006.

WOOLVERTON, C. J.; HAYWOOD, V. B.; HEYMANN, H. O. Toxicity of two carbamide peroxide products used in nightguard vital bleaching. **American Journal of Dentistry**, v. 6, n. 6, p. 310-314, 1993.

APÊNDICE A



Cytotoxicity and genotoxicity of sodium percarbonate: a comparison with bleaching agents commonly used in discolored pulpless teeth

Journal:	<i>International Endodontic Journal</i>
Manuscript ID:	IEJ-09-00180.R1
Manuscript Category:	Original Scientific Article
Keywords:	cytotoxicity test, genotoxicity test, pulpless teeth, tooth bleaching, toxicity test



Review

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Cytotoxicity and genotoxicity of sodium percarbonate: a comparison with bleaching agents commonly used in discolored pulpless teeth

M.R. Fernández¹, R.V. Carvalho¹, F.A. Ogliari¹, F.A. Beira², A. Etges¹ & M. Bueno¹

¹ School of Dentistry, Federal University of Pelotas, Pelotas, RS, Brazil

² Department of Pharmacology, Institute of Biology, Federal University of Pelotas, RS, Brazil.

Cytotoxicity and genotoxicity of bleaching agents

Keywords: cytotoxicity test, genotoxicity test, pulpless teeth, tooth bleaching, toxicity test.

***Reprint request:** Universidade Federal de Pelotas, Faculdade de Odontologia, Departamento de Odontologia Restauradora. Rua Gonçalves Chaves, 457/504 – Centro, Pelotas – RS, Brazil – CEP: 96015-560. Fone/Fax: +55 53 32226690, e-mail: raquelitaftm@gmail.com

Abstract

Aim To evaluate the cytotoxicity and genotoxicity of sodium percarbonate in comparison with bleaching agents used on discolored pulpless teeth.

Methodology The cytotoxicity and genotoxicity of bleaching agents were evaluated both in their pure form as well as at concentrations commonly used in clinical practice. Hydrogen peroxide (HP), carbamide peroxide (CP), sodium perborate (SP) and sodium percarbonate (SPC) were diluted in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) in series. To evaluate the cytotoxicity, the survival of 3T3/NIH mouse fibroblasts was measured photometrically by using an MTT assay after a 24h exposure period. Genotoxicity was indicated by micronuclei (MN) formation and modification of the normal cell was analyzed by light microscopy (400x). Statistical analysis was performed by one-way ANOVA, followed by a multiple-comparison Tukey post hoc test ($p < 0.05$).

Results All tested groups exhibited a dose-dependent cytotoxicity. However, CP showed a similar cytotoxic effect when compared with DMEM untreated control (UC) group. PH and SPC were significantly more cytotoxic than SP. The genotoxicity test showed that SPC and SP had an intermediate rate of MN frequency when compared with the UC group. The mean rate of MN frequency for HP was higher and statistically more significant than for the other groups tested. No difference was observed when CP and UC groups were compared.

Conclusions SPC showed cytotoxicity and genotoxicity similar to those of the other products tested in this study. However, before PCS is used clinically, studies should be conducted to confirm its safety *in vivo*.

Introduction

Intracoronar bleaching is a simple and conservative alternative method to improve the color of discolored pulpless teeth successfully, since little tooth structure is lost and the cost of treatment is minimal (Lizem *et al.* 2004, Asfora *et al.* 2005, Joiner *et al.* 2008). Nowadays, the most commonly used bleaching agents for whitening endodontically treated teeth are hydrogen peroxide (HP) and HP releasing agents, such as sodium perborate (SP) and carbamide peroxide (CP), all of these used in different concentrations, alone or in combination (Attin *et al.* 2003, Farmer *et al.* 2006, Plotino *et al.* 2008). As the active agent of bleaching products, when HP comes into contact with dental tissues, it acts by forming free radicals and active oxygen molecules that dissociate the unsaturated double bond of dark colored molecules into smaller, more diffusible, and lighter colored molecules (Kawamoto & Tsujimoto 2004, Joiner 2006, Goldberg *et al.* 2007).

Despite the efficacy and safety of bleaching treatment being well recognized (Joiner 2006, Mahony *et al.* 2006), it is important to know that tooth bleaching can have some adverse biological effects (Kinomoto *et al.* 2001, Tredwin *et al.* 2006). If the bleaching agent comes into contact with the buccal tissue during treatment, some damage to mucosa and periodontal ligament may occur (Kinomoto *et al.* 2001, Dahl & Pallesen 2003, Plotino *et al.* 2008). However, this irritation is usually mild and transient (Mahony *et al.* 2006, Meireles *et al.* 2008). External cervical root resorption has been described as another possible complication after internal bleaching procedures (Friedman 1997, Dahl & Pallesen 2003). The increase in dental tissue permeability produced by bleaching agents facilitates the diffusion of oxidizing agents

1
2
3 through the dentinal tubules, which can reach the periodontium (Costa *et al.*
4 2000, Carrasco *et al.* 2003). Although the occurrence of cervical resorption after
5
6 bleaching treatment is low, several studies have demonstrated that the
7
8 combination of internal bleaching, especially with a high concentration of HP,
9
10 and a history of trauma, orthodontic treatment and dental surgery, may be
11
12 predisposing factors for cervical root resorption (Heller *et al.* 1992, Baratieri *et*
13
14
15
16
17
18 *al.* 1995, Heithersay 1999).

19
20
21 Similarly, it has been demonstrated that reactive oxygen and free
22
23 radicals released by bleaching products in contact with cells are able to interact
24
25 with deoxyribonucleic acid (DNA) causing some oxidative damage, such as
26
27 strands and chromosomal breakage and also alter the DNA repair ability
28
29 (Kawamoto & Tsujimoto 2004, Ribeiro *et al.* 2005). However, a meticulous
30
31 clinical evaluation (Dahl & Pallesen 2003) followed by effective isolation of
32
33 buccal tissues and the placement of internal protective barriers with cements to
34
35 prevent whitening products from diffusing through the cementum enamel
36
37 junction are indispensable approaches to minimizing the undesirable adverse
38
39 effects previously mentioned (Goldberg *et al.* 2007). Moreover, to reduce the
40
41 potential oxidative damage, many authors have suggested avoiding the use of
42
43 strong oxidizers such as HP at a high concentration, indicating the use of SP or
44
45 CP, which are considered safer than HP (Kinomoto *et al.* 2001, Attin *et al.* 2004,
46
47
48
49
50
51
52 Goldberg *et al.* 2007).

53
54
55 Some years ago, sodium percarbonate (SPC), available as a white
56
57 granule product, used as a bleach in the detergent industry, was described as
58
59 another peroxide releasing agent available to improve the color of discolored
60
pulpless teeth (Kaneko *et al.* 2000). Dissolved in water, SPC breaks down into

sodium carbonate and hydrogen peroxide. Therefore, the bleaching performance of SPC appears to be similar to that of SP (Kaneko *et al.* 2000). Although there are no formulations containing this product available in the market for intracoronaral bleaching procedures, nowadays SPC can be found in the silicone polymer formulations for overnight vital bleaching procedures (Kim *et al.* 2004, Gokay *et al.* 2005, de A Silva *et al.* 2006). However, no studies proving the safety of SPC have yet been reported in literature. Therefore, the purpose of this study was to compare SPC with different bleaching agents used in discolored pulpless teeth, with regard to their cytotoxicity and genotoxicity.

Materials and Methods

This project was approved by the Research Ethics Committee of the Federal University of Pelotas, Protocol number 047/2008.

Reagents

The bleaching agents tested were: Sodium Perborate (SP), Sodium Percarbonate (SPC), Hydrogen Peroxide (HP) and Carbamide Peroxide (CP). SP and HP were acquired from Synth (São Paulo, Brazil). CP was bought from Vetec Química Fina (Rio de Janeiro, Brazil) and SPC from Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA). The culture medium was obtained from GIBCO (Grand Island, New York, USA). All others reagents were from Sigma (Sigma Chemical Company, St. Louis, USA)

Dilutions of Bleaching Agents

To test the pure form of each product, bleaching agents were diluted in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM). Series of dilutions were

prepared ranging between 10 mM and 0.001 mM. In addition, to evaluate bleaching agents at the concentration commonly used in clinical practice, series of dilution from 10^{-1} to 10^{-5} were prepared (Kinomoto et al. 2001). They were also prepared in DMEM at the following concentrations: HP (30%), CP (37%), PS (2 g/mL in water), PS (2 g/mL in PH 30%), PCS (2 g/mL in water) and PCS (2 g/mL in PH 30%).

Cell Culture

The cell culture medium was DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 2% L-glutamine, penicillin (100 U/ml) and streptomycin (100 mg/ml). Mouse fibroblasts of the 3T3/NIH immortalized cell line were maintained as a stock culture in DMEM and incubated at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ in air until subconfluency.

Cytotoxicity Assay (MTT Assay)

The 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay was used to assess cell metabolic function by mitochondrial dehydrogenase activity. Mouse fibroblasts 3T3/NIH (2×10^4 /well) were maintained in DMEM in 96-well plates for 24h. Cytotoxicity produced by different dilutions of bleaching agents was assessed in a 24h cell exposure time. After removing the test product, cells were washed with phosphate-buffered saline (PBS). Then 200 µL of medium with 20 µL of MTT solution (5 mg of MTT/mL PBS) were added 2×10^4 to each cell well. After 5h of incubation at 37°C in darkness, the blue formazan precipitation was extracted from the mitochondria using 200 µL/well dimethyl sulfoxide (DMSO) on a shaker for 5 minutes at 150 rpm. The absorption at 540 nm was determined

spectrophotometrically. All experiments were performed three times. The same protocol was used to test the pure form of bleaching agents as well as to test the concentration commonly used in clinical practice.

Genotoxicity Assay (Micronuclei Test)

Fibroblasts were grown until subconfluence in 25 cm² cell culture flasks under the same conditions as those related above. Cells were cultured for 5 days to obtain an exponential growth before being exposed to the dental bleaching agents. After this, cells were detached with 0.15% trypsin for 5 min and 5 mL of complete medium was added and cells were centrifuged at 1,500 rpm for 5 minutes. For each experimental group 5 x 10⁵ cells were submitted to 0.1 mM of bleaching products in cell culture flasks (25 cm²). This concentration was chosen because it provides an intermediate cytotoxic effect. Thus, a significant number of viable cells could be evaluated. After 24h, cells were detached again with 0.15% trypsin for 5 minutes, 5 ml of complete medium was added and the cells were centrifuged at 1,500 rpm for 5 minutes. Then the cells were fixed on glass slides in 3:1 methanol/acetic acid for 30 min. The cells were dried and lysed in 1N HCl for 40 min. DNA-containing structures were stained with Schiff's reagent for 2 hours and 30 min at room temperature in darkness. Afterwards, the glass slides were rinsed in distilled water and dried again. Next, the glass slides were immersed in Fast Green for 10s and afterwards washed three times in ethanol. The coded slides were assessed by light microscopy at 400x magnification. A total of 3000 cells per preparation were analyzed. Micronuclei were identified as DNA-containing structures in the cytoplasm, separated from the main nucleus, and with an area smaller than 1/3 of the main

nucleus, according to the criteria described by Countryman and Heddle (Countryman & Heddle 1976).

Statistical Analysis

The cell viability data (absorbance) and genotoxicity (frequency of micronuclei) were analyzed with SigmaStat 3.0 (SPSS, Chicago, IL, USA) statistics program for Windows. The statistical analysis was performed by one-way ANOVA followed by a multiple-comparison Tukey post hoc test. The level of significance was set at $p < 0.05$.

Results

The cytotoxicity of the pure form of bleaching agents determined after a 24h exposure period using the MTT assay is represented in Figure 1. All groups tested exhibited a dose-dependent cytotoxic effect demonstrated by the reduction in the absorbance value, with the exception of CP, which showed results similar those of the DMEM untreated control (UC) group ($p < 0.05$). At the highest concentration tested (10 and 1.0 mM) it was observed that PH, SPC and SP were significantly more cytotoxic than CP. However, it was also noted in Figure 1 that at the 1.0 mM concentration SPC and PH had a higher cytotoxic effect than SP.

When the bleaching agents were evaluated at the clinical concentration, the highest cytotoxic effect was observed for PH (30%), PCS (2g/mL in water), PS (2g/mL 30% HP) and PCS (2g/mL 30% HP); followed by SP (2g/mL in water) and finally for CP 37%, which exhibited the lowest cytotoxicity in comparison with UC ($p < 0.05$) (Figure 2).

The results of the genotoxicity test are shown in the Table 1. A comparison was made of micronuclei (MN) frequency after 24h cell exposure to bleaching agents. SPC and SP showed an intermediate rate of MN in comparison with the UC group ($p < 0.05$). The mean rate of MN frequency for hydrogen peroxide was higher (22.33 ± 2.08) and statistically more significant than it was for the other groups tested. Moreover, no difference was observed when the CP (7.67 ± 2.08) and UC groups (7.00 ± 1.00) were compared.

Discussion

To ensure the efficacy and safety of the materials used for bleaching teeth, they are usually evaluated by their speed and ability to recover the natural color of the teeth and by their potential of causing damage to surrounding tissues (Carrasco *et al.* 2003). Cytotoxicity and genotoxicity assays have been considered a good tool for initial assessment of the toxic effects of dental materials (Freshney 2001). These tests allow a careful control of the physico-chemical and physiological environment; reduce animal experimentation; are economical; controllable and reproducible (Schmalz 1994, Freshney 2001). In this case, bleaching agents were tested using 3T3 mouse fibroblasts, which is a cell line used in many studies because it is well characterized, reproducible, and is a good initial screening model for evaluating dental materials (Schmalz 1994).

When the cytotoxicity of products in the pure form was evaluated after 24h of cell exposure it was possible to observe that HP, SP, and SPC in all dilutions tested (10 to 0.001 mM) presented a decrease in the cell metabolic activity when compared with the untreated control (UC) group (Figure 1a, 1c

and 1d). In agreement with this, Hanks *et al* in 1993 showed a decrease in succinyl dehydrogenase activity after the application of serial dilutions of HP in cell monolayer cultures. In addition, Kinomoto *et al* in 2001, reported that even sodium perborate, which is considered to be a relatively safe bleaching agent, presented a toxic effect in contact with periodontal ligament cells.

Cytotoxicity of bleaching agents at a concentration commonly used in dental practice was also compared. The low cytotoxicity of 37% CP was confirmed, as opposed to the finding of Aren (2003), which showed a rate of 60% cell viability values for HP and 30% for CP when tested in FM3A cell culture. The toxicity of SP in water solution (2g/mL) was intermediate when compared with the other tested products (Aren 2003). However, the mixture of SP and 30% HP (2g/mL) showed greater cytotoxicity on 3T3 cells than any agent by itself. In this context, Kinomoto *et al* in 2001, also demonstrated that 30% HP by itself or in combination with SP is more toxic to periodontal ligament cells when compared with a SP in a water solution. These data are important since studies have demonstrated a similar efficacy of SP either alone or in a mixture with 3% to 30% of HP (Rotstein *et al*. 1993, Ari & Ungor 2002), suggesting that the combination of these products would not be necessary to obtain a desirable bleaching effect.

Kaneko *et al* in 2000, in an *in vitro* study showed that solutions of SPC in water or 30% HP had a good bleaching effect on artificially stained pulpless teeth, as an alternative tooth whitening product. Nevertheless, due to its chemical nature SPC seems to be similar to SP, SPC in all forms tested, and HP (30%) was proved to be significantly more cytotoxic than SP in water (2g/mL), mainly at the higher concentration evaluated. However, SPC, SP and

HP, showed the same cytotoxic effect when SP was tested in combination with 30% HP (2g/mL). Based on these results, it could be suggested that SPC in a solution, can release a significant number of peroxide molecules. Hence, they may be able to act on the cells causing more intense toxic effects than SP. Nevertheless, to confirm this hypothesis other specific studies will be necessary.

Moreover, when tissues are exposed to free radicals released by bleaching agents, they can cause some oxidative damage to lipids, proteins and nuclei acids, depending on the accessibility of free radicals to target the DNA (Dahl & Pallesen 2003, Attin et al. 2004, Asfora et al. 2005). In this context, the MN are DNA masses with the appearance of small nuclei found in the cytoplasm of cells that are capable of dividing themselves, representing a variety of segregational DNA defects (de Almeida et al. 2004). Thus, the induction of micronuclei (MN) is considered an effective biomarker to provide information on the cytogenetic damage in the tissues and process associated with the induction of DNA damage (Fenech et al. 1999, Ramirez & Saldanha 2002). In this study, the results have clearly demonstrated that bleaching agents contribute to DNA damage, showing an increase in the MN frequency after cell exposure to all bleaching agents tested. SPC as well as SP exhibited an intermediate frequency of MN in comparison with the other groups. The potential of bleaching agents based on HP has been reported to increase the risk of oral cancer, particularly in susceptible populations, such as smokers and drinkers (Ribeiro et al. 2005). Nevertheless, the most reliable and strongest scientific evidence has indicated that HP used in bleaching agents is not a carcinogen, either systemic or at the site-of contact (Mahony et al. 2006).

Therefore, the data presented in this study have only revealed that the products in contact with cell cultures exhibited endpoints of genetic damage.

To sum up, a correlation between the frequency of fibroblast micronucleated cells and the cell survival rate shown for each product in the cytotoxicity test was observed. However, it must be taken into consideration that the clinical situation may yield different results. Indeed, the toxicity of HP can be significantly reduced when administrated in cell cultures in the presence of enzymes such as catalases and peroxidases (Dahl & Pallesen 2003). Since HP is synthesized as an active metabolite in human tissues (Attin *et al.* 2003, Goldberg *et al.* 2007) a variety of enzymatic mechanisms provide protection from this oxidative reagent, catalyzing the decomposition of HP into water and oxygen (Attin *et al.* 2003, Mahony *et al.* 2006). Thus, the results of this *in vitro* study may provide the initial answers to the behavior of the biological material. Therefore, it cannot be directly applied to *in vivo* situations.

Conclusion

Despite the limitations of the present *in vitro* study, it can be concluded that SPC is a bleaching agent with cytotoxicity and genotoxicity similar to those of the other products commonly used for this purpose. However, before PCS is clinically used as a bleaching agent for discolored pulpless teeth, studies should be conducted to confirm the safety of this product *in vivo*.

References

Aren G (2003) In vitro effects of bleaching agents on FM3A cell line. *Quintessence International* **34**, 361-365.

Ari H, Ungor M (2002) In vitro comparison of different types of sodium perborate used for intracoronar bleaching of discoloured teeth. *International Endodontic Journal* **35**, 433-436.

Asfora KK, Santos Mdo C, Montes MA, de Castro CM (2005) Evaluation of biocompatibility of sodium perborate and 30% hydrogen peroxide using the analysis of the adherence capacity and morphology of macrophages. *Journal of Dentistry* **33**, 155-162.

Attin T, Hannig C, Wiegand A, Attin R (2004) Effect of bleaching on restorative materials and restorations--a systematic review. *Dental Materials* **20**, 852-861.

Attin T, Paque F, Ajam F, Lennon AM (2003) Review of the current status of tooth whitening with the walking bleach technique. *International Endodontic Journal* **36**, 313-329.

Baratieri LN, Ritter AV, Monteiro S, Jr., Caldeira de Andrada MA, Cardoso Vieira LC (1995) Nonvital tooth bleaching: guidelines for the clinician. *Quintessence International* **26**, 597-608.

Carrasco LD, Froner IC, Corona SA, Pecora JD (2003) Effect of internal bleaching agents on dentinal permeability of non-vital teeth: quantitative assessment. *Dental Traumatology* **19**, 85-89.

Costa CA, Mesas AN, Hebling J (2000) Pulp response to direct capping with an adhesive system. *American Journal of Dentistry* **13**, 81-87.

Countryman PI, Heddle JA (1976) The production of micronuclei from chromosome aberrations in irradiated cultures of human lymphocytes. *Mutation Research* **41**, 321-332.

Dahl JE, Pallesen U (2003) Tooth bleaching--a critical review of the biological aspects. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine* **14**, 292-304.

de Almeida TM, Leitao RC, Andrade JD, Becak W, Carrilho FJ, Sonohara S (2004) Detection of micronuclei formation and nuclear anomalies in regenerative nodules of human cirrhotic livers and relationship to hepatocellular carcinoma. *Cancer Genetics and Cytogenetics* **150**, 16-21.

de A Silva MF, Davies RM, Stewart B *et al.* (2006) Effect of whitening gels on the surface roughness of restorative materials in situ. *Dental Materials* **22**, 919-924.

- Farmer DS, Burcham P, Marin PD (2006) The ability of thiourea to scavenge hydrogen peroxide and hydroxyl radicals during the intra-coronal bleaching of bloodstained root-filled teeth. *Australian Dental Journal* **51**, 146-152.
- Fenech M, Holland N, Chang WP, Zeiger E, Bonassi S (1999) The HUman MicroNucleus Project--An international collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans. *Mutation Research* **428**, 271-283.
- Freshney I (2001) Application of cell cultures to toxicology. *Cell Biology and Toxicology* **17**, 213-230.
- Friedman S (1997) Internal bleaching: long-term outcomes and complications. *Journal of American Dental Association* **128**, 51S-55S.
- Gokay O, Mujdeci A, Algin E (2005) In vitro peroxide penetration into the pulp chamber from newer bleaching products. *International Endodontic Journal* **38**, 516-520.
- Goldberg M, Bohin F, Bonnet E, Claisse-Crinquette A, Dartigues J, Louis J (2007) Tooth bleaching treatments - A Review. *ADF Medical Devices Commission*, 1-50.
- Hanks CT, Fat JC, Wataha JC, Corcoran JF (1993) Cytotoxicity and dentin permeability of carbamide peroxide and hydrogen peroxide vital bleaching materials, in vitro. *Journal of Dental Research* **72**, 931-938.
- Heithersay GS (1999) Invasive cervical resorption: an analysis of potential predisposing factors. *Quintessence International* **30**, 83-95.
- Heller D, Skriber J, Lin LM (1992) Effect of intracoronal bleaching on external cervical root resorption. *Journal of Endodontics* **18**, 145-148.
- Joiner A (2006) The bleaching of teeth: a review of the literature. *Journal of Dentistry* **34**, 412-419.
- Joiner A, Hopkinson I, Deng Y, Westland S (2008) A review of tooth colour and whiteness. *Journal of Dentistry* **36**, S2-7.
- Kaneko J, Inoue S, Kawakami S, Sano H (2000) Bleaching effect of sodium percarbonate on discolored pulpless teeth in vitro. *Journal of Endodontics* **26**, 25-28.
- Kawamoto K, Tsujimoto Y (2004) Effects of the hydroxyl radical and hydrogen peroxide on tooth bleaching. *Journal of Endodontics* **30**, 45-50.

Kim JH, Lee YK, Lim BS, Rhee SH, Yang HC (2004) Effect of tooth-whitening strips and films on changes in color and surface roughness of resin composites. *Clinical Oral Investigation* **8**, 118-122.

Kinomoto Y, Carnes DL, Jr., Ebisu S (2001) Cytotoxicity of intracanal bleaching agents on periodontal ligament cells in vitro. *Journal of Endodontics* **27**, 574-577.

Lim MY, Lum SO, Poh RS, Lee GP, Lim KC (2004) An in vitro comparison of the bleaching efficacy of 35% carbamide peroxide with established intracoronary bleaching agents. *International Endodontic Journal* **37**, 483-488.

Mahony C, Felter SP, McMillan DA (2006) An exposure-based risk assessment approach to confirm the safety of hydrogen peroxide for use in home tooth bleaching. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* **44**, 75-82.

Meireles SS, Demarco FF, dos Santos Ida S, Dumith Sde C, Bona AD (2008) Validation and reliability of visual assessment with a shade guide for tooth-color classification. *Operative Dentistry* **33**, 121-126.

Plotino G, Buono L, Grande NM, Pameijer CH, Somma F (2008) Nonvital tooth bleaching: a review of the literature and clinical procedures. *Journal of Endodontics* **34**, 394-407.

Ramirez A, Saldanha PH (2002) Micronucleus investigation of alcoholic patients with oral carcinomas. *Genetic Molecular Research* **1**, 246-260.

Ribeiro DA, Marques ME, Salvadori DM (2005) Assessment of genetic damage induced by dental bleaching agents on mouse lymphoma cells by single cell gel (comet) assay. *Journal of Oral Rehabilitation* **32**, 766-771.

Rotstein I, Mor C, Friedman S (1993) Prognosis of intracoronary bleaching with sodium perborate preparation in vitro: 1-year study. *Journal of Endodontics* **19**, 10-12.

Schmalz G (1994) Use of cell cultures for toxicity testing of dental materials--advantages and limitations. *Journal of Dentistry* **22**, S6-11.

Tredwin CJ, Naik S, Lewis NJ, Scully C (2006) Hydrogen peroxide tooth-whitening (bleaching) products: review of adverse effects and safety issues. *British Dental Journal* **200**, 371-376.

Woolverton CJ, Haywood VB, Heymann HO (1993) Toxicity of two carbamide peroxide products used in nightguard vital bleaching. *American Journal of Dentistry* **6**, 310-314.

Table 1 - Frequency of micronucleated (MN) cells per 1000 cells after 24 h of exposition to bleaching agents (n=3).

Groups	Mean	Standard deviation ($\pm$ SD)
Hydrogen peroxide	22.33 ^c	$\pm$ 2.08
Sodium perborate	17.00 ^b	$\pm$ 1.00
Sodium percarbonate	16.00 ^b	$\pm$ 1.02
Carbamide peroxide	7.67 ^a	$\pm$ 2.08
Untreated control (DMEM)	7.00 ^a	$\pm$ 1.00

Different letters indicates significant differences between means ($p < 0.05$). DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium

Figure legends

Figure 1

Cytotoxic effect of the tested bleaching agents (pure form) after 24h of cell exposure. Absorbance values (mean ± SD) of the five dilutions (10 to 0.001 mM) of each product in comparison with control group are represented. Multiple comparisons among different bleaching agents are also shown. Different letters indicate statistical difference (p<0.05).

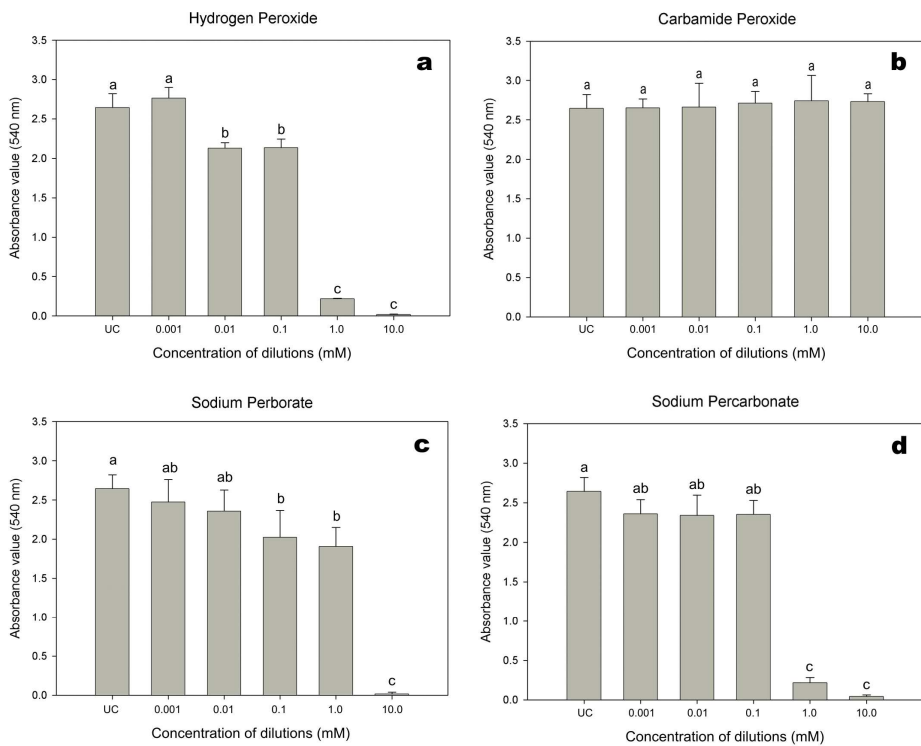
Figure 2

Cytotoxic effect of the tested bleaching agents (at clinical concentrations) after 24h of cell exposure. Absorbance values (mean ± SD) of the five dilutions (1×10^{-1} a 1×10^{-5}) of each product in comparison with the control group are represented. Multiple comparisons among different bleaching agents are also shown. Different letters indicate statistical difference (p<0.05).

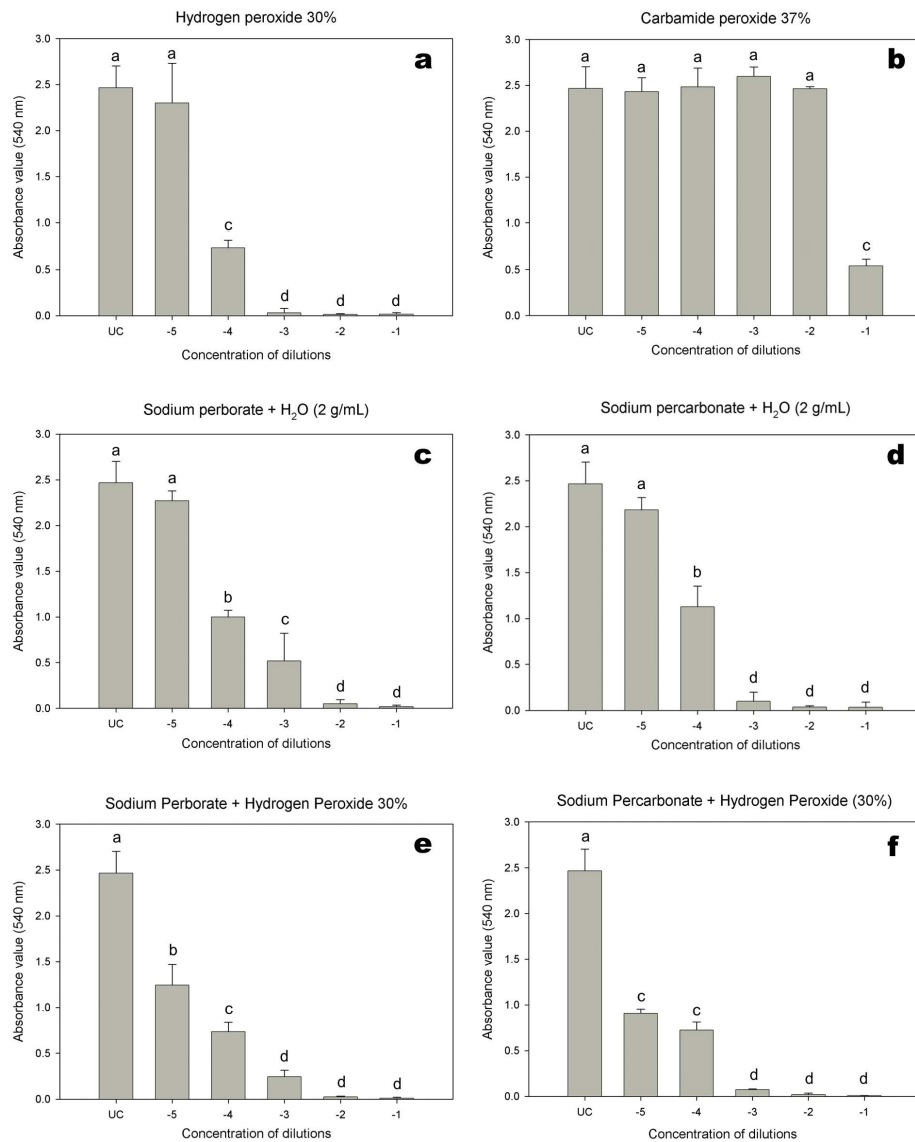
Acknowledgements

The authors are grateful to CNPq (Conselho Nacional de Pesquisa) for the scholarship support.

For Peer Review



Cytotoxic effect of the tested bleaching agents (pure form) after 24h of cell exposure. Absorbance values (mean ± SD) of the five dilutions (10 to 0.001 mM) of each product in comparison with control group are represented. Multiple comparisons among different bleaching agents are also shown. Different letters indicate statistical difference (p<0.05).



Cytotoxic effect of the tested bleaching agents (at clinical concentrations) after 24h of cell exposure.

Absorbance values (mean $\pm$ SD) of the five dilutions (1×10^{-1} a 1×10^{-5}) of each product in comparison with the control group are represented. Multiple comparisons among different bleaching agents are also shown. Different letters indicate statistical difference ($p < 0.05$).

APÊNDICE B

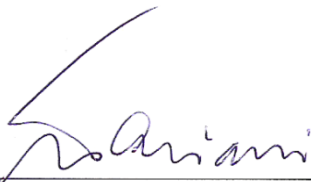


MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

PELOTAS, 04 de novembro de 2008.

PARECER Nº 047 /2008

O projeto de pesquisa intitulado: “**CITOTOXICIDADE, GENOTOXICIDADE E EFICÁCIA DE AGENTES CLAREADORES EXPERIMENTAIS,**” está constituído de forma adequada, cumprindo, nas suas plenitudes preceitos éticos estabelecidos por este Comitê e pela legislação vigente recebendo, portanto, **PARECER FAVORÁVEL** à sua execução.


Prof. Marcos Antonio Torriani
Coordenador do CEP/FO/UFPEL

Prof. Marcos A. Torriani
Coordenador
Comitê de Ética e Pesquisa