

Efeitos sistêmicos provocados pelo peróxido de carbamida: estudo *in vitro* e *in vivo*

Alessandra Dutra da Silva
Paulo Oliva de Borba

RESUMO

Objetivos: Avaliar a citotoxicidade do peróxido de carbamida, em diferentes concentrações, para uma linhagem de células de hamster (estudo *in vitro*), bem como seus efeitos sistêmicos em um ensaio *in vivo*. Métodos: Utilizou-se teste de citotoxicidade pela análise de viabilidade celular, bem como a análise histoquímica do rim e do fígado, comparando o grupo controle e grupos testes, caracterizados pela ingestão de peróxido de carbamida na água de abastecimento em diferentes concentrações: 1,9mg/ml (teste 1), 0,95mg/ml (teste 2), 0,71mg/ml (teste 3), 0,47mg/ml (teste 4) e 0,24mg/ml (teste 5) num período de 40 dias. Resultados: O agente clareador se mostrou altamente citotóxico nas concentrações de $IC_{50} = 0,4mM$. Além disso, foi observada alteração significativa no hemograma em relação à contagem de eritrócitos, no volume corpuscular médio, concentração de hemoglobina, contagem dos neutrófilos segmentados e número de linfócitos. Em relação às enzimas, na contagem de ureia, foram observadas alterações estatisticamente significativas entre o grupo controle e os grupos testes 1 e 2 ($p=0.0000$). Para a contagem de fosfatase alcalina, no vigésimo dia, foram encontrados resultados com diferença estatística entre o grupo controle e os grupos testes 2, 3, 4, e 5 ($p=0.0009$). Além disso, mudanças morfológicas no fígado e rim também foram observadas. Conclusão: O peróxido de carbamida, nas diferentes concentrações estudadas, determinou alterações sistêmicas significativas, demonstrando a importância de cautela no uso deste medicamento na Odontologia, a fim de evitar danos irreversíveis para a saúde do paciente.

Palavras-chave: Peróxido de Carbamida; efeitos sistêmicos; Citotoxicidade.

Systemic effects caused by carbamide peroxide: *In vitro* and *in vivo* study

ABSTRACT

Objectives: To evaluate the cellular cytotoxicity effects of carbamide peroxide at different concentrations in a hamster cell line in an *in vitro* study and its systemic effects in an *in vivo* assay. Methods: Cell cytotoxicity assay by cellular viability analysis and histochemical evaluation of kidney and liver morphology were performed comparing the control group and test groups, which were characterized by the ingestion of carbamide peroxide in the water supply at different concentrations: 1.9mg/ml (1), 0.95mg/ml (test 2), 0.71mg/ml (test 3), 0.47mg/ml (test 4) and 0.24mg/ml (test 5) for a period of 40 days. Results: The bleaching

Alessandra Dutra da Silva – Doutora em Odontologia, Professora do curso de Odontologia, Departamento de Patologia Oral, Universidade Luterana do Brasil – Canoas/RS.

Paulo Oliva de Borba – Doutor em Odontologia, Professor do curso de Odontologia, Departamento de Fisiologia, Universidade Luterana do Brasil – Canoas/RS.

Autor correspondente: Alessandra Dutra da Silva. Curso de Odontologia. Rua Dona Ondina, Número 242, Complemento 502. CEP: 90850-020. Porto Alegre/RS. Telefone: (55) 9988.6962.

E-mail: dra.alessandradutra@gmail.com

Stomatos	Canoas	Vol. 24	Nº 46	p.41-54	Jan./Jun. 2018
----------	--------	---------	-------	---------	----------------

agent was cytotoxic at concentrations of $IC_{50} = 0.4\text{mM}$. In addition, a significant alteration of the blood count was observed in erythrocyte count, mean corpuscular volume, hemoglobin concentration, segmented neutrophil count and lymphocyte count. Regarding the enzymes, urea counts showed statistically significant changes between the control group and test groups 1 and 2 (Tukey index = 5.34, $p = 0.0000$) and alkaline phosphatase counts between the control group and the test groups 2, 3, 4, and 5 (Tukey's index = 10.72, $p = 0.0009$). Changes in liver and kidney morphology were also observed. Conclusion: Carbamide peroxide in the different concentrations studied can provide significant systemic alterations, demonstrating the importance of using this drug with caution in dentistry, in order to avoid irreversible damage to the patient.

Keywords: Carbamide peroxide; Systemic effects; Cytotoxicity.

INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, o uso da técnica de clareamento dental tem aumentado significativamente. Isto se deve à grande variabilidade de produtos no mercado, ao desenvolvimento de novas técnicas, bem como ao uso indiscriminado e inadequado dos agentes clareadores (1,2). Além disso, o clareamento caseiro é considerado uma técnica prática, simples e de baixo custo (3,4).

No entanto, todas as técnicas de clareamento conhecidas, até então, têm limitações e podem proporcionar complicações ao paciente (3,5,6). Os riscos de efeitos adversos produzidos pelos agentes clareadores sem o envolvimento e monitoramento de um dentista podem ser significativos. Os mais conhecidos são danos aos tecidos moles produzidos pelo contato do agente clareador com a mucosa, os quais podem ser transitórios, como irritação gengival, e aos tecidos duros como a sensibilidade dentária moderada. Infelizmente, outros efeitos mais graves como danos ao complexo dentino-pulpar e efeitos sistêmicos têm sido observados (7,8,9).

As várias técnicas de clareamento têm diferentes graus de risco e efeitos colaterais para os pacientes, a depender da técnica utilizada, da regularidade de realização da mesma e controle realizado pelo dentista (10).

Um estudo *in vitro* avaliou a toxicidade celular dos agentes clareadores e observou que diferentes concentrações do agente clareador, peróxido de carbamida, proporcionam uma elevada toxicidade celular e esta tem um efeito dose-dependente na viabilidade celular. Além disso, o agente clareador reduziu a produção de diferentes tipos de colágeno (11).

Com base nisso, esta pesquisa teve como objetivo avaliar os efeitos da toxicidade celular do peróxido de carbamida em diferentes concentrações para uma linhagem de células de hamster, abrangendo estudo *in vitro* e seus efeitos sistêmicos em um ensaio *in vivo*.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foi utilizada a linhagem celular padrão CHO-K1 (epitelioides) procedente de ovário de hamster (*Mesocricetus burcer*), registrada como ATCC CCL 61 pela coleção americana de cultivos celulares, cedida pelo Dr. Félix Sanz do Instituto de Saúde Carlos III de Madrid. Os cultivos foram feitos em monocamada, utilizando placas de Petri de poliestireno e meio de cultivo líquido HAMS-F12 modificado, tamponado com 1,18 g/l de NaHCO_3 e HEPES 25mM à pH 7,4 (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO. EEUU). Este meio foi suplementado com 10% de soro fetal bovino (GmbH, Alemanha) termicamente inativado (56°C, 30 minutos) e antibióticos (100mg/ml de estreptomomicina e 100U/ml de penicilina). Os cultivos foram feitos no Instituto de Toxicologia de Castilla e León (INTOXCAL) no incubador (Erlross/3862) a 37°C com uma umidade relativa de 85%.

Ensaio *in vitro* de citotoxicidade celular

O efeito do peróxido de carbamida foi determinado por meio de células CHO-K1 cultivadas em placas de microtitulação de poliestireno com 96 poços. Em cada lugar, inoculou-se 200µl de meio contendo 2×10^4 células (65% de confluência), durante 24h a 37°C. Após este período, o meio de cultivo foi recolocado com meio fresco, incluindo o agente tóxico à concentração desejada. A citotoxicidade foi determinada seguindo o método vermelho neutro (VN), a fim de avaliar a viabilidade celular.

O ensaio para avaliar a viabilidade celular com vermelho neutro (VN) foi realizado de acordo com as diretrizes de Borenfeund e Puevner (1985). Depois de 24h de incubação das células, com as diferentes concentrações do peróxido de carbamida (5, 10, 15, 20 e 25mM), o meio de cultivo foi misturado com meio que continha VN à concentração de 40µg/ml, e que havia sido preparado, mantido a 37°C e filtrado, com uma antevisão de 24h. As placas foram incubadas durante 3h, em temperaturas ótimas para cada linhagem celular, visando permitir a internalização de VN nos lisossomas das células viáveis. A seguir, recolocou-se, então, o meio de cultivo com solução de fixação, sendo então lavado (0,5% formaldeído, 1% CaCl_2 em H_2O) e adicionado a 200µl de uma solução de ácido acético a 1% em etanol a 50%. Depois de uma agitação rápida da placa durante 20 min, a coloração foi determinada num leitor de placas de ELISA (Merck/Mios) equipado com um filtro de 540nm.

O peróxido de carbamida foi colocado nos grupos testes em uma concentração média de 0-10mM, durante um período de exposição de 24h. Realizou-se uma análise qualitativa de citotoxicidade celular por comparação dos grupos experimentais com os grupos controle, cuja densidade populacional foi considerada em 100%. O efeito letal do peróxido de carbamida foi realizado na presença e ausência de 6U/ml de catalase, com a finalidade de avaliar se o efeito deletério era devido a formação de H_2O_2 em meio de cultura.

Os grupos controles foram tratados unicamente com catalase durante o mesmo período e concentração, mostrando ausência de citotoxicidade.

Ensaio *in vivo*

Foram selecionados 48 ratos (*Rattus norvegicus*), albinos, tipo wistar do biotério da Universidade Luterana do Brasil, com peso entre 290 e 300g, em condições controladas de luz e temperatura, com acesso livre a comida e bebida, desde o início até o fim do experimento.

Posteriormente, foram aleatoriamente separados em seis grupos: um grupo controle, o qual recebeu somente água e ração; e cinco grupos testes submetidos a ingestão de peróxido de carbamida na água de abastecimento nas concentrações de 1,9mg/ml (teste 1), 0,95mg/ml (teste 2), 0,71mg/ml (teste 3), 0,47mg/ml (teste 4) e 0,24mg/ml (teste 5) durante um período de 40 dias. As análises do efeito de peróxido de carbamida sobre o sangue e enzimas foram realizadas nos laboratórios da Universidade Luterana do Brasil, Canoas-POA, nos laboratórios de Fisiologia, Mutagênese e Biotério.

A coleta de sangue foi realizada com os animais anestesiados por micropunção com catéteres microcapilares diretamente no plexo retro-ocular dos animais. Foram realizados os exames hematológicos e histoquímicos (hemograma, leucograma, plaquetas, ureia e fosfatase alcalina) em 3 tomadas de sangue (dia zero, vigésimo dia e quadragésimo dia). Os exames hematológicos foram analisados automaticamente pelo equipamento Cell-Dyn 1400, já os exames histoquímicos (ureia e fosfatase alcalina) foram realizados por método manual.

A análise estatística para a etapa de avaliação dos efeitos sistêmicos do peróxido de carbamida, nas diferentes concentrações, foi por meio do teste ANOVA e Tukey (least significant difference). Foram considerados estatisticamente significantes os grupos que apresentavam $p < 0,05$.

RESULTADOS

Análise da citotoxicidade

Na Figura 1, podemos observar a citotoxicidade do peróxido de carbamida na presença e ausência de catalase. As células foram incubadas durante 24h com uma média de concentração de 0-10mM, na ausência (○) e presença (■) de 6U/ml de catalase. O efeito citotóxico pela incorporação de VN foi comprovado pela aproximação probit/log (inserção na figura) com a média de 0-1,5mM; obtendo-se a reta da figura ($r^2 = 0,98$) com $IC_{50} = 0,40mM$, ou seja, (média IC = 1,4mM e do $IC_{90} = 0,10mM$) confirmando a citotoxicidade do branqueador dental.

Os resultados demonstraram que o agente clareador mostrou-se um poderoso citotóxico a concentrações de $IC_{50} = 0,4mM$. Paralelamente, incluiu-se catalase no meio de cultivo com o objetivo de comprovar se a toxicidade do peróxido de carbamida esteve associada à liberação lenta de peróxido de hidrógeno. Efetivamente, a catalase cessou o efeito citotóxico em todas as concentrações testadas, o que determina que a toxicidade do agente clareador se deve a formação de água oxigenada na cavidade bucal.

O gráfico da Figura 1 mostra um claro efeito dose/resposta como consequência da adição de peróxido de carbamida. O valor de IC_{50} foi determinado mediante a aproximação da curva probit/log dos resultados de viabilidade celular, valor de 0,40mM (média do $IC_{90} = 0,10mM$; $IC = 1,4mM$). A presença de catalase no meio de cultura anulou por completo o efeito tóxico do clareador, o que demonstra que unicamente a liberação de H_2O_2 foi responsável pela citotoxicidade.

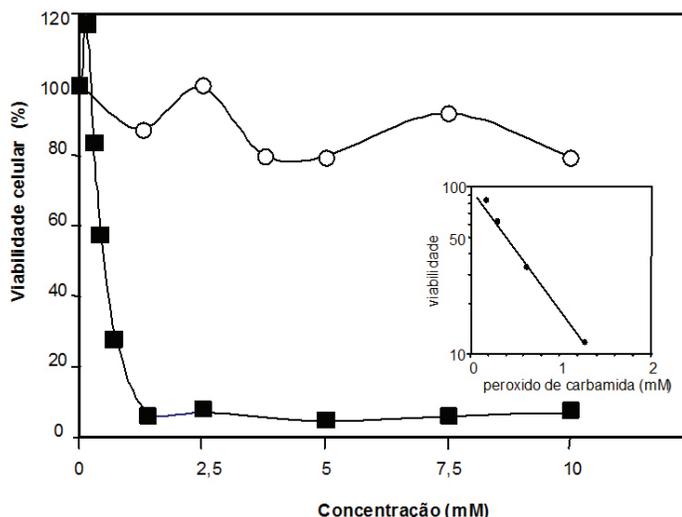


FIGURA 1 – Gráfico da viabilidade das células C.H.O. em peróxido de carbamida 10%.

Resultados dos efeitos sistêmicos do peróxido de carbamida no sangue e enzimas específicas

Foram avaliados 144 hemogramas realizados nos animais dos diferentes grupos controle e testes nas concentrações de 1,9mg/ml (teste 1), 0,95mg/ml (teste 2), 0,71mg/ml (teste 3), 0,47mg/ml (teste 4) e 0,24mg/ml (teste 5) durante um período de 0, 20 e 40 dias, e foi observada alteração significativa na contagem de eritrócitos (Figura 2), no Volume Corpuscular Médio (VCM) (Figura 3) e na Concentração de Hemoglobina (CHCM) (Figura 4).

Na avaliação do leucograma, foram encontradas alterações significativas na contagem dos neutrófilos segmentados (Figura 5), no número de eritrócitos (Figura 6) e na avaliação de linfócitos (Figura 7).

Em relação às enzimas, a contagem de ureia no vigésimo dia mostrou resultado com diferença estatística entre o grupo controle e os grupos testes 1 e 2, (índice de Tukey foi =5.34, sendo o $p=0.0000$ e no quadragésimo dia o índice de Tukey foi =5.50, sendo o $p=0.0000$), para a diferença do resultado significativo entre o grupo controle e todos os outros grupos testes (Figura 8).

Em nosso trabalho, não encontramos alterações nas enzimas pesquisadas, com exceção da fosfatase alcalina. Na contagem de Fosfatase alcalina, vigésimo dia foi encontrado resultado com significância estatística entre o grupo controle e os grupos testes 2, 3, 4, e 5, pois o índice de Tukey foi =10.72, sendo o $p=0.0009$ (Figura 9).

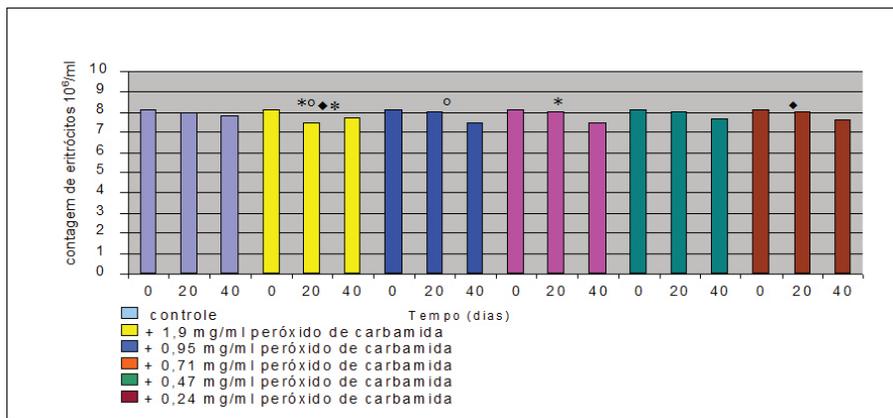


FIGURA 2 – Contagem eritrocitária (10^6 eritrócitos/ml) do grupo controle e diferentes grupos experimentais nas concentrações de 1,9mg/ml (teste1), 0,95mg/ml (teste 2), 0,71mg/ml (teste 3), 0,47mg/ml (teste 4) e 0,24mg/ml (teste 5) durante um período de 0, 20 e 40 dias. Cada valor deste gráfico representa a média de 8 animais \pm DP. Foi encontrado $p=0,0064$ e $F=3.7848$ pelo ANOVA (Tukey), no 2º exame (20 dias) na diferença entre todos os grupos e o grupo teste 1, portanto com significância estatística.

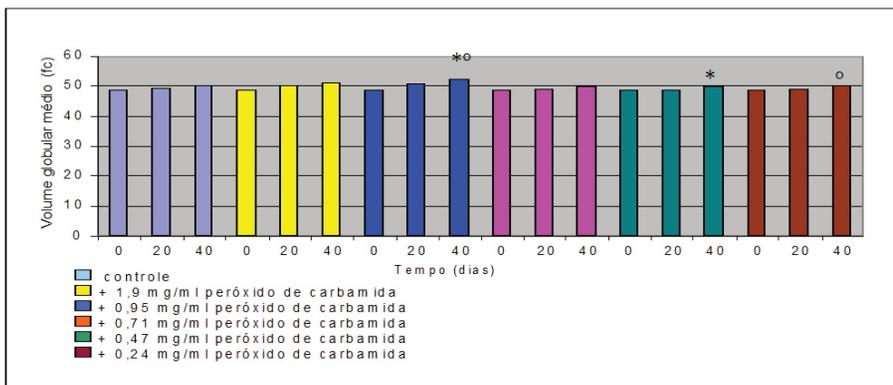


FIGURA 3 – Contagem do Volume Globular Médio (MCV), avaliado em (fL), nos dias 0, 20, e 40, período de exposição ao peróxido de carbamida nos animais dos grupos testes 1,9mg/ml (teste1), 0,95mg/ml (teste 2), 0,71mg/ml (teste 3), 0,47mg/ml (teste 4) e 0,24mg/ml (teste 5) e controle. Foi encontrada alteração significativa no tempo de 40 dias, no grupo teste 2 e os gr e testes 3 e 4, pois a diferença entre os grupos citados, para encontrar o índice de Tukey foi =2.3722 na diferença entre esses grupos, sendo o $p=0.0225$ e $F=2.9547$.

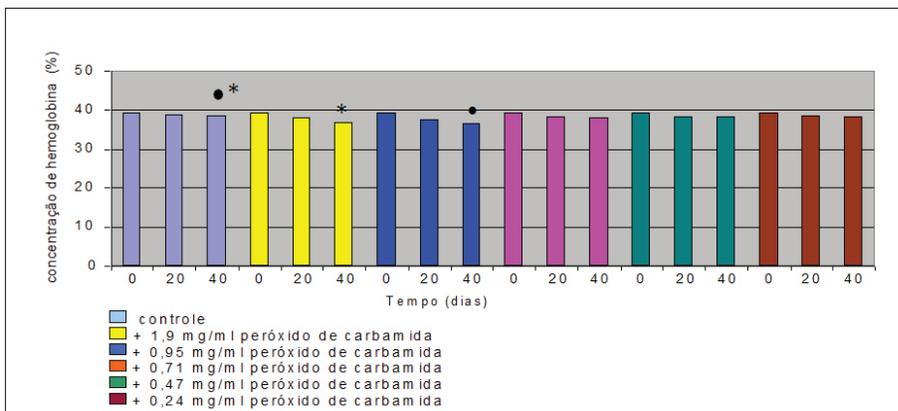


FIGURA 4 – Contagem da concentração de hemoglobina (MCHC) medida em percentual (%), nos dias 0, 20 e 40, nos grupos test 1,9mg/ml (teste1), 0,95mg/ml (teste 2), 0,71mg/ml (teste 3), 0,47mg/ml (teste 4) e 0,24mg/ml (teste 5) e controle, por período de exposição ao peróxido de carbamida. Cada valor deste gráfico representa a média de oito animais \pm DP. No dia 40, foi encontrado resultado significante entre os grupos testes 1 e 2 frente ao grupo controle, pois o índice de Tukey foi =1.2432 na diferença entre esses grupos, sendo o $p=0.0001$ e $F=6.6207$.

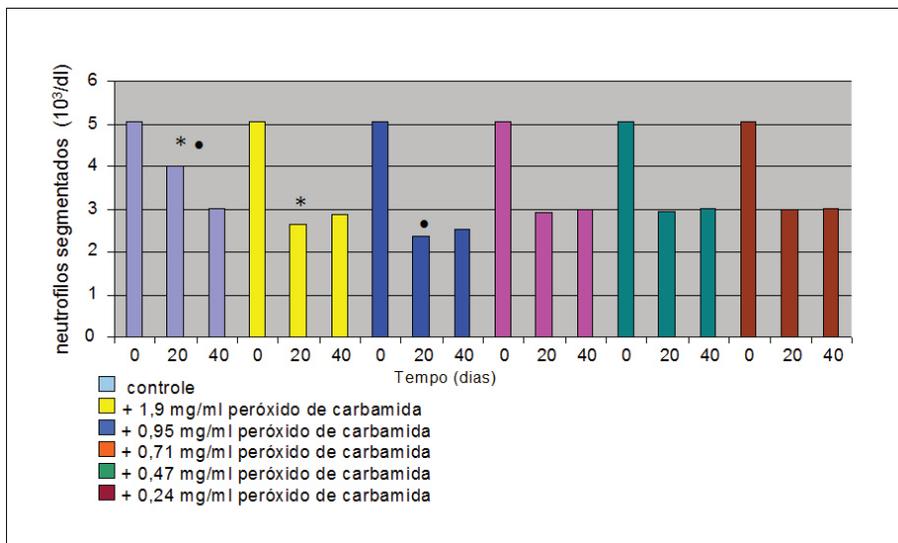


FIGURA 5 – Contagem média dos neutrófilos segmentados dos diferentes grupos teste e controle, durante os dias 0, 20 e 40. A análise estatística no dia 20 revelou alteração significante, pois obtivemos $p=0.0020$ e $F=4.5803$, comprando a diferença entre o grupo controle e os grupos testes 1 e 2, sendo o índice de Tukey=1.052.

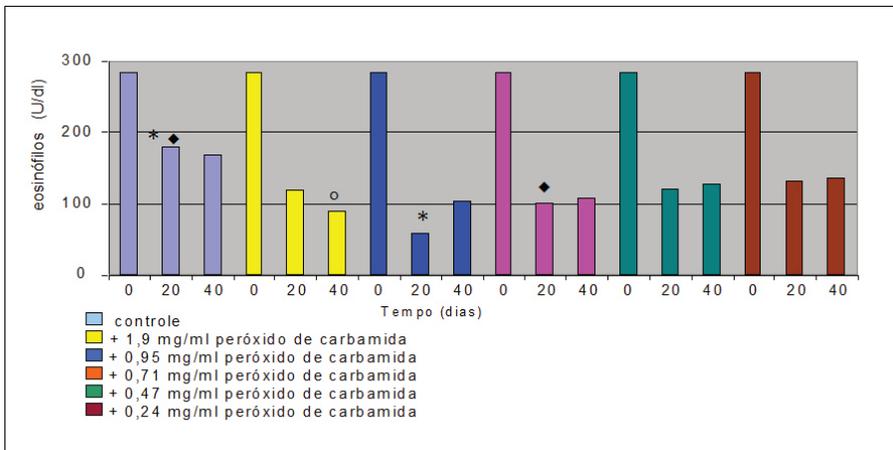


FIGURA 6 – Contagem média de eosinófilos, avaliados em unidades por microlitro (uL), nos diferentes grupos teste e controle, durante os dias 0, 20 e 40. A análise estatística no dia 20 revelou alteração significativa, pois obtivemos $p=0.0013$ e $F=4.8677$, diferença evidenciada entre o grupo controle e os grupos testes 2 e 3, com índice de Tukey=72.43. No dia 40, alteração significativa obtida com $p=0.0493$ e $F=2.4471$, diferença encontrada entre o grupo controle e o grupo teste 1.

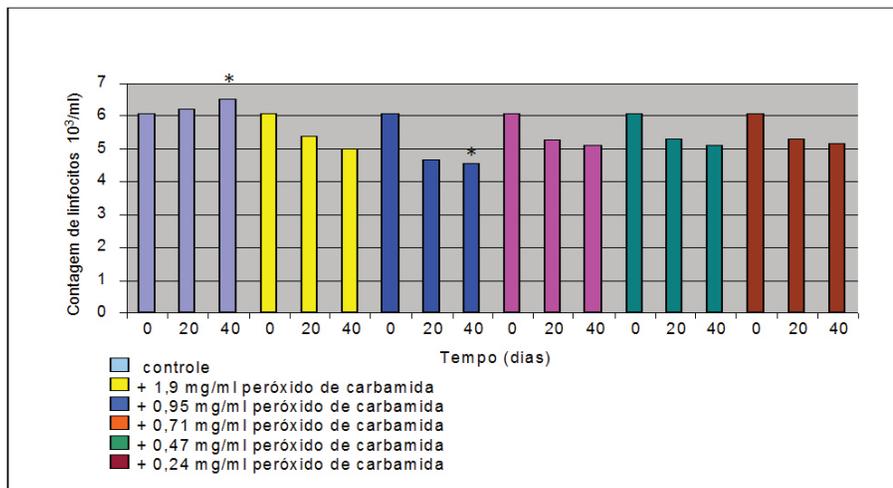


FIGURA 7 – Contagem linfocitária (10^3 linfócitos/ml) dos diferentes grupos teste e controle, Contagem linfocitária (10^3 linfócitos/ml), durante o período de exposição ao peróxido de carbamida. Cada valor deste gráfico representa a média de oito animais \pm DP. A análise estatística no quadragésimo dia mostrou alteração significativa, $p=0.0331$ e $F=2.7046$, evidenciado entre o grupo teste 2 e o grupo controle (índice de Tukey=1.647).

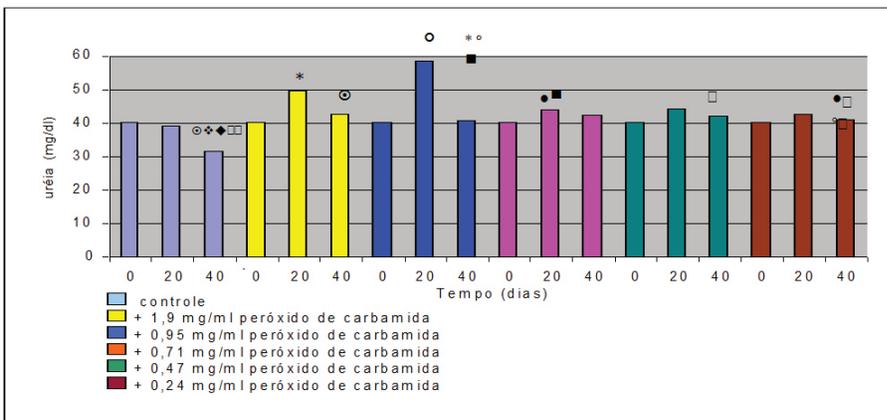


FIGURA 8 – Contagem de ureia nos diferentes grupos teste e controle, durante os dias 0, 20 e 40. A análise no vigésimo dia revelou alteração significativa, $p=0.0000$ e $F=27.4036$, com índice de Tukey=5.34, com diferença entre o grupo controle e os grupos testes 1, 2 e 3, no quadragésimo dia houve alteração significativa, $p=0.0000$ e $F=9.4347$, com índice de Tukey=5.50, evidenciando diferença entre o grupo controle e todos os grupos testes.

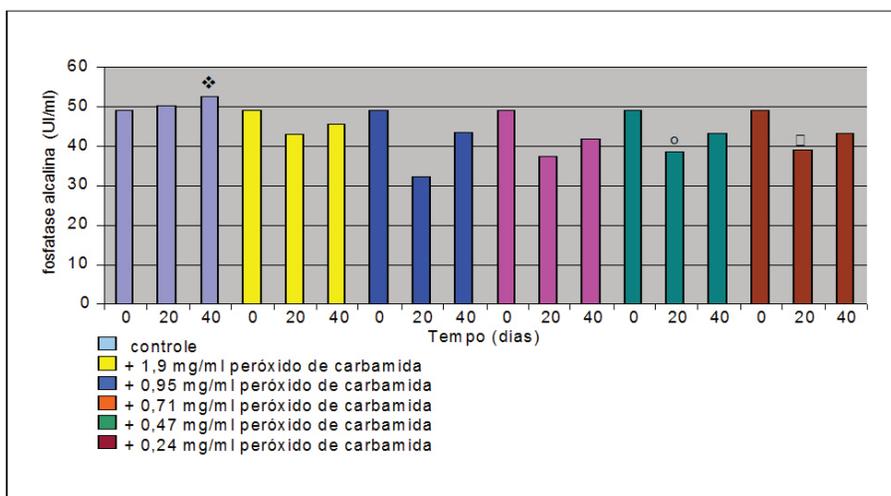


FIGURA 9 – Contagem de fosfatase alcalina (U/ml) nos diferentes grupos testes e controle, durante os dias 0, 20 e 40, período em que os animais estiveram expostos ao peróxido de carbamida. Cada valor deste gráfico representa a média de oito animais \pm DP. A análise estatística no vigésimo dia revelou significância estatística, pois obtivemos $p=0.0009$ e $F=5.1625$, diferença constatada entre o grupo controle e os grupos testes 2, 3, 4 e 5, com índice de Tukey=10.72, no quadragésimo dia revelou $p=0.1072$ e $F=1.9444$.

Reações do rim frente ao uso do peróxido de carbamida

As fotomicrografias do labirinto cortical do córtex renal possuem como característica os corpúsculos renais, que confere um aspecto estriado do grupo controle (Fig. 10), o que não acontece nos grupos testes 3 (0,71mg/ml) e 4 (0,47mg/ml) ilustrados nas Figuras 11 e

12. Além disso, o grupo controle mostrou o espaço capsular delimitado entre os folhetos parietais e viscerais, aspecto inexistente nos grupos testes 3 e 4 que mostraram distorção entre os dois folhetos.

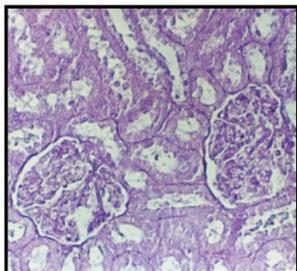


FIGURA 10 – Grupo controle, fotomicrografia de rim (100X).

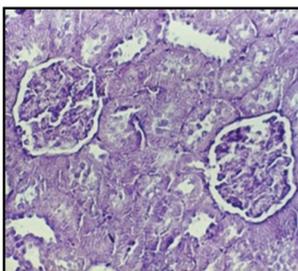


FIGURA 11 – Grupo teste 3, fotomicrografia de rim (100X).

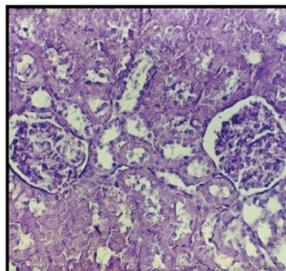


FIGURA 12 – Grupo teste 4, fotomicrografia de rim (100x).

Quando comparadas as figuras do grupo controle frente às figuras dos grupos testes no aspecto de diferenciação dos túbulos distais e proximais, observou-se total ausência da membrana basal dos referentes túbulos nos grupos testes 3 e 4, impossibilitando sua identificação ou diferenciação em túbulos contorcidos distais e proximais, evidenciada na Figura 14, onde o peróxido de carbamida foi administrado em dose similar à que é usada em humanos. Também se salientam as alterações que ocorreram quanto à forma e à luz dos túbulos contorcidos distais e proximais que se confundem em várias zonas das Figuras 14 e 15, nota-se o aspecto de seus diâmetros tubulares, que estão totalmente distorcidos, com maior nitidez no grupo teste 3, que sofreu com maior intensidade a ação do peróxido de carbamida.

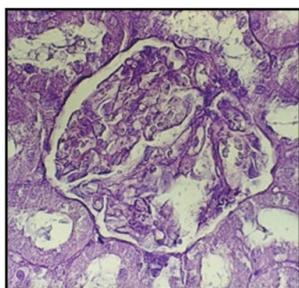


FIGURA 13 – Grupo controle, fotomicrografia de rim (100X).

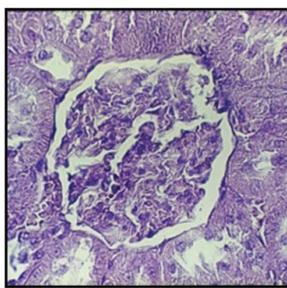


FIGURA 14 – Grupo teste 3, fotomicrografia de rim (100X).

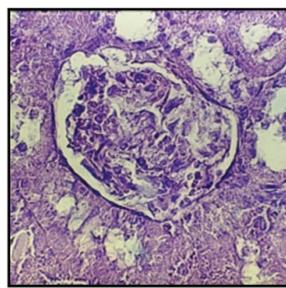


FIGURA 15 – Grupo teste, fotomicrografia de rim (100x).

Reações do fígado ante o uso do peróxido de carbamida

Na Figura 16, pode-se observar que um grande número de hepatócitos aparece uniformemente disposto na sua forma característica, ou seja, concêntrica em relação à veia centrolobular com as células de Kupfer apresentando núcleo oval como característica, forma natural de reconhecimento. As veias centrolobulares, sua característica distinta, é o conjunto de sinusoides de seu lóbulo que deságua em sua parede, escassa de tecido conjuntivo circundante, além de apresentar aspecto circular.

De forma diferente, as Figuras 17 e 18 que são respectivamente dos grupos teste 3 e 4, mostra o grupo teste 4 com aspecto organizacional do lóbulo hepático diferente do grupo controle: existe uma irregularidade notória nos sinusoides, pois eles têm seu espaço diminuído, edema dos hepatócitos, evidenciados pela falta de limite celular e diminuição da veia centrolobular.

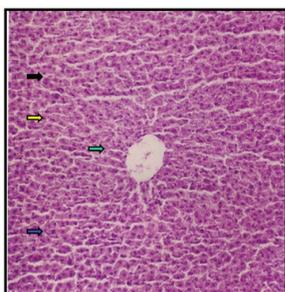


FIGURA 16 – Fígado grupo controle, aumento de 100X. Na seta preta (sinusoides); amarela (células de Kupfer); verde (Veia centrolobular) e seta azul – os hepatócitos.

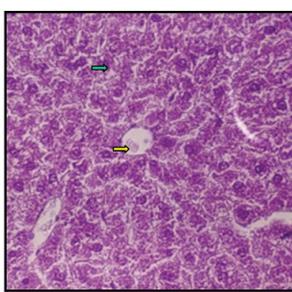


FIGURA 17 – Fígado, grupo teste 3, aumento de 100X. Na seta verde, aparecem os sinusoides; na seta amarela, veia centrolobular.

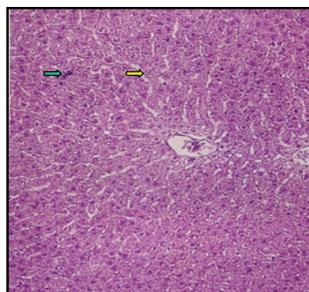


FIGURA 18 – Fígado do grupo teste 4, aumento de 100X. Na seta amarela há os sinusoides, na verde, os hepatócitos.

Na sequência, fotomicrografia do grupo controle de fígado com um aumento de 400X (Fig. 19), mostrando a parte central de um lóbulo hepático que mostra a definição de membrana celular hepatocitária, com espaço considerado normal para os sinusoides, presença de canaliculo biliar, célula de Kupfer e tamanho considerado normal e aspecto da veia centrolobular, onde se evidencia o deságue de sinusoides diretamente em sua luz, fenestrados por delgados poros de tecido colágeno, que caracteriza sua normalidade de aspecto saudável.

A Figura 20, que pertence ao grupo teste 4, mostra irregularidade dos sinusoides (diminuição de seu espaço) quando comparada a fotomicrografia do grupo controle, provocando um enfartamento dos hepatócitos, como evidenciado, alterando o calibre da veia centrolobular para um diâmetro menor, além de um aumento da quantidade de células de Kupfer, talvez por estimulação do sistema macrofágico perante o peróxido de carbamida. Na Figura 21 evidencia-se: maior edema dos hepatócitos, diminuição

acentuada dos sinusoides, diminuição flagrante da luz da veia centrolobular e aumento do núcleo das células de Kupfer.

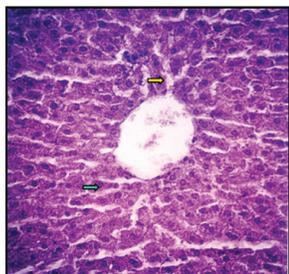


FIGURA 19 – Fígado grupo controle, com aumento de 400X. Na seta amarela presença de sinusoides; seta verde, os hepatócitos.

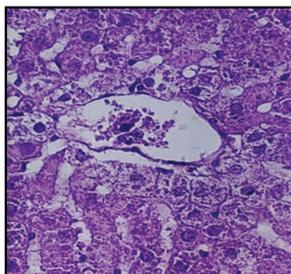


FIGURA 20 – Fígado do grupo teste 4, aumento de 400X.

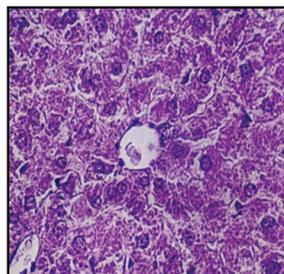


FIGURA 21 – Fígado do grupo teste 3, aumento de 400X.

DISCUSSÃO

A literatura já tem demonstrado a eficácia do peróxido de carbamida como agente clareador, entretanto são escassos estudos sobre os seus efeitos sistêmicos (8,9). Dessa forma, o objetivo desta pesquisa foi avaliar as possíveis alterações citotóxicas, hematológicas e histoquímicas, além de modificações nos órgãos como no fígado e rins provocadas por este medicamento. As alterações sanguíneas encontradas pelo uso de peróxido de carbamida, tornaram-se evidenciadas na contagem leucocitária com alterações moderadas encontradas nos neutrófilos bastonados, principalmente nos grupos testes mais tóxicos (grupo testes 1 e 2), com mais nitidez no último dia do experimento (dia 40).

Na contagem média de eosinófilos, também foram encontradas alterações, principalmente no grupo teste 2, no vigésimo dia do experimento. Os monócitos do grupo controle mantiveram sempre uma tendência para valores mais altos, visto que se tratavam de animais jovens que estavam adequando seu sistema imunológico para o restante da vida. Quando estes mesmos animais (mesmo pedigree, porém pertencentes aos grupos testes) foram tratadas com peróxido de carbamida, em todos os grupos testes, foi perceptível uma tendência acentuada a queda monocitária. Isto também foi observado na contagem média de linfócitos. Nos demais constituintes, não foram observadas alterações significativas. Salienta-se que esses são resultados inéditos na literatura.

A análise das enzimas como a dosagem de ureia sobre o uso de peróxido de carbamida revelou um incremento como era esperado, pois o peróxido de carbamida tem em seus constituintes a ureia. Nas enzimas avaliadas, não foram encontradas alterações significativas, com exceção da fosfatase alcalina (enzima básica dos processos de tecidos mineralizados). Neste exame, o grupo controle sempre manteve uma tendência a alta

na contagem de fosfatase alcalina durante o experimento. Enquanto nos grupos testes, principalmente na contagem média realizada no vigésimo dia, houve uma tendência à diminuição sanguínea enzimática da fosfatase alcalina.

Acredita-se que qualquer órgão para exercer adequadamente sua fisiologia está na dependência direta da saúde em sua estrutura. Sendo assim, as diferentes lâminas histológicas obtidas nesse estudo demonstraram, de forma bastante clara, que o peróxido de carbamida nas diferentes concentrações utilizadas, que são subclínicas e clínicas na atividade odontológica, provocaram evidentes alterações no órgão hepático. Além disso, foi observado que este medicamento provocou também uma significativa desorganização tecidual no fígado.

Quanto ao aspecto renal estudado, foi evidente a impossibilidade gerada pelo peróxido de carbamida para diferenciar os túbulos distais e proximais, a total ausência da membrana basal dos referidos túbulos, impossibilitando, dessa forma, sua identificação ou diferenciação em túbulos contorcidos distais ou proximais, porém mais flagrante se torna o aspecto de seus diâmetros tubulares, que ficaram totalmente distorcidos pelo uso do peróxido de carbamida. Acrescenta-se que, nas lâminas histológicas dos animais do grupo controle, tanto o polo vascular quanto o polo urinário do corpúsculo renal estão visíveis, sendo que estas características de normalidade não se apresentam nos elementos dos grupos testes, que sofreram a ação do medicamento clareador.

Em concordância com esses achados, Paula et al.(9) observaram a citotoxicidade sistêmica do peróxido de hidrogênio, por meio de um estudo *in vivo* e análise dos seus efeitos em diferentes concentrações sob a mucosa gástrica de animais saudáveis, e observou a presença de lesões na mucosa gástrica nos grupos expostos ao agente clareador após 3 a 4 dias do uso do medicamento, demonstrando a necessidade de controle do uso do clareador, a fim de minimizar os danos e possíveis riscos provocados por esta substância.

Estudo *in vitro* mostrou que as células expostas ao peróxido de carbamida nas diferentes concentrações, apresentavam diminuição da viabilidade celular com e sem a presença de catalase e que quando na presença da catalase as células se protegem (12). Em concordância com os achados encontrados neste trabalho.

Entretanto, esta pesquisa apresentou algumas limitações tanto decorrentes da análise *in vivo* devido as diferenças fisiológicas observadas nos ratos, quando comparadas aos humanos, assim como pela análise *in vitro*, a qual mostra um ambiente menos complexo do que o organismo vivo, porém estes estudos são uma etapa necessária antes da realização dos testes clínicos realizados em seres humanos.

CONCLUSÕES

Concluiu-se que o peróxido de carbamida nas diferentes concentrações estudadas pode proporcionar alterações sistêmicas significativas. Assim, torna-se necessária

a realização de novos estudos clínicos com intuito de avaliar a toxicidade deste medicamento, a fim de demonstrar a importância do uso desta substância com cautela na odontologia, com intuito de evitar danos irreversíveis ao paciente.

REFERÊNCIAS

1. Lambert DL. Motivación estética y blanqueamiento dental vital. *Sig Inter*. 2000;**5**:5-9.
2. Sarret DC. Tooth whitening today. *J Am Dent Assoc*. 2002;**133**:1535-41.
3. Dahl JE, Pallesen U. Tooth bleaching – a critical review of the biological aspects. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2003;**14**:292-304.
4. Gökay O, Müjdeci A, Algn E. Peroxide penetration into the pulp from whitening strips. *J Endod*. 2004;**30**:887-9.
- 5- Haywood VB. New bleaching considerations compared with at-home bleaching. *J Esthet Restor Dent*. 2003;**15**:184-7.
6. Kelleher MG, Roe FJ. The safety-in-use 10% carbamide peroxide (Opalescence) for bleaching teeth under the supervision of a dentist. *Br Dent J*. 1999;**187**:190-4.
7. Caballero AB, Navarro LF, Lorenzo JA. In vivo evaluation of the effects of 10% carbamide peroxide and 3.5% hydrogen peroxide on the enamel surface. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2007;**12**:E404-7.
8. Da Silva AD, Kijner M, Wiltgen A, de Borba PA. Toxic effects of carbamide peroxide on the dentin-pulp complex. *Stomatos* 2016; **22**: 13-19.
9. Paula AB, DIAS MI, Ferreira MM, T Carrilho T, Marto CM, Casalta J, Cabrita AS, Carrilho E. Effects on gastric mucosa induced by dental bleaching – an experimental study with 6% hydrogen peroxide in rats. *J Appl Oral Sci*. 2015; **23**:497-507
10. Matis BA, Wang Y, Eckert GJ, Cochran MA, Jiang T. Extended bleaching of tetracycline-stained teeth: a 5-year study. *Oper Dent*. 2006; **31**:643-51.
11. Tipton DA, Braxton SD, Dabbous MK. Role of saliva and salivary components as modulators of bleaching agent toxicity to human gingival fibroblasts in vitro. *J Periodontol*. 1995; **66**:766-74.
12. Bowles WH, Burns H. Catalase/peroxidase activity in dental pulp. *J Endod*. 1992; **18**:527-34.