Influência do peróxido de carbamida sobre a gengiva marginal – estudo em camundongos

Carbamide peroxide influence on marginal gingiva – a study in mice

Gerson Arisoly Acasigua* Fernanda Pasquetti Marques** Anna Christina Medeiros Fossati***

Resumo

Objetivo: este estudo tem como objetivo avaliar a gengiva marginal de camundongos submetidos ao contato com o peróxido de carbamida, simulando a técnica de clareamento caseiro. Materiais e método: vinte ratos foram divididos em quatro grupos, três grupos com diferentes durações na aplicação do agente clareador de peróxido de carbamida 16% e um grupo controle. Os animais foram sacrificados conforme os períodos determinados, e a remoção da mandíbula na altura correspondente ao incisivo central, envolvendo a mucosa gengival da região, foi fixada e processada para confecção de cortes histológicos e análise histomorfológica da região. Resultados: a análise dos resultados mostrou que existe uma formação de cones epiteliais, hiperplasia e processo inflamatório maior nos animais dos grupos em que se aplicou o gel clareador por dez e quinze dias em relação ao grupo controle. Conclusão: com base nos achados deste estudo, pode-se concluir que os agentes clareadores podem alterar diretamente a morfologia tecidual, podendo a exposição da mucosa oral a esses produtos predispor os tecidos a riscos danosos elevados.

Palavras-chave: Peróxido de carbamida. Mucosa gengival. Camundongos.

Introdução

Existe um aumento expressivo da demanda por serviços relacionados à harmonização corporal, o que se reflete na exponencial procura por tratamentos odontológicos estéticos, como o clareamento dental. Desde que foi descrito em 1989, tal procedimento encontra-se cada vez mais difundido na prática odontológica¹. Enquanto grandes empresas cosméticas vendem o procedimento de clareamento dental como minimamente invasivo e seguro, pesquisadores questionam os potenciais efeitos nocivos de tal procedimento, tais como o efeito carcinogênico e a capacidade de injúrias aos tecidos moles e mineralizados^{2,3}.

A terapia clareadora consiste em utilização tópica, sobre o dente, de um agente oxidante (peróxido de carbamida ou de hidrogênio) capaz de quebrar macromoléculas que o pigmentam. De maneira geral, a concentração utilizada desses agentes depende da técnica empregada. É importante ressaltar que existem duas técnicas distintas para o procedimento de clareamento dental. Na técnica de clareamento dental em consultório, o paciente submetese ao procedimento sob supervisão do cirurgião-

http://dx.doi.org/10.5335/rfo.v20i3.5494

^{*} Mestre em Odontologia, Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

[&]quot; Cirurgiã-dentista, Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

^{***} Doutora em Odontologia, Departamento de Ciências Morfológicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

-dentista. Já no clareamento dental caseiro, com a utilização de placas de copolímero etileno/acetato de Vinila (EVA), é o próprio paciente que aplica o agente clareador a ser utilizado durante o procedimento. Uma vez que tal procedimento é feito em domicílio, durante o tratamento existe o risco de extravasamento do material clareador, ocorrendo o contato com os tecidos orais. Assim, a segurança de tal procedimento torna-se questionável, uma vez que sua fórmula possui produtos químicos que podem agredir os tecidos orais⁴.

Na técnica caseira, quando o gel é aplicado diariamente com auxílio de moldeiras individuais, os géis mais comumente utilizados contém peróxido de carbamida em concentrações entre 10% e 22%, ou peróxido de hidrogênio apresentando concentrações entre 5% e 11%. Quando a técnica de consultório é empregada, as concentrações mais utilizadas são de 35% e 37% de peróxido de carbamida⁴. Assim, tendo em vista o risco existente no tratamento clareador caseiro, uma vez que os agentes clareadores atuam penetrando no esmalte, na dentina e na mucosa oral como compostos oxidantes, podendo ocasionar alterações nos tecidos envolvidos nesse processo, o objetivo deste estudo foi avaliar a gengiva marginal de camundongos submetida ao contato com o peróxido de carbamida.

Materiais e método

O presente trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais e pela Comissão de Pesquisa em Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Projeto nº 22.473.

Vinte camundongos albinos CF1, machos, com idade média de oito a dez semanas e peso médio de 40 a 45 gramas, foram utilizados no estudo. Os animais foram mantidos em estantes ventiladas, com temperatura controlada ($22 \pm 1^{\circ}$ C) e ciclo claro--escuro de 12 horas. Foram fornecidas ração e água filtrada ad libitum. Os protocolos realizados estavam de acordo com as recomendações para o cuidado com animais de laboratório e normas éticas para a experimentação em animais conscientes do Guia de Uso e Cuidado com Animais Laboratoriais, do National Institutes of Health dos Estados Unidos da América, que são adotadas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal. Os animais foram distribuídos randomicamente entre os seguintes grupos (n = 5):

- a) grupo 1 (controle): aplicação do gel inerte por quinze dias;
- b) grupo 2: aplicação do gel inerte por dez dias, seguido de cinco dias de aplicação do gel clareador;
- c) grupo 3: aplicação do gel inerte por cinco dias, seguido de dez dias de aplicação do gel clareador;
- d) grupo 4: aplicação do gel clareador por quinze dias.

Para a aplicação sobre a mucosa marginal do agente clareador (Whiteness Perfect, FGM, peróxido de carbamida 16%), ou do gel inerte (gel de carbopol 940N 0,5% neutralizado) utilizado como controle, os animais foram anestesiados com quetamina e xilazina, 100 mg/kg e 10 mg/kg, respectivamente (Virbaxyl®, Virbac do Brasil Indústria e Comércio Ltda.). Os géis foram aplicados por 1 hora/dia, durante quinze dias, conforme o grupo experimental.

Decorrida uma quinzena do início da aplicação dos agentes sobre a mucosa oral, os animais foram eutanasiados e as áreas de interesse de análise removidas e imersas em formalina neutra tamponada 10% por 24 horas. As amostras foram embebidas em parafina e, por meio de um micrótomo (Leica RM 2025, Nussloch, Baden - Württemberg, Germany), lâminas histológicas com 4 µm de espessura foram confeccionadas e coradas com hematoxilina de Harris e eosina alcoólica.

As lâminas histológicas foram analisadas por um examinador experiente, calibrado e cego em relação às laminas analisadas. Para isso, foi utilizado um microscópio (BX41TF, Olympus) com a magnificação de 100x, 200x e 400x. A cada dez lâminas analisadas, o examinador repetia a análise de três laminas aleatoriamente para manutenção da calibração.

Os eventos teciduais avaliados foram: a) atrofia epitelial, caracterizada pela ausência de camada epitelial; b) hipertrofia epitelial, caracterizada pela hipertrofia da camada epitelial; c) presença de cones epiteliais, verificada na região de contato entre tecido epitelial e conjuntivo; d) processo inflamatório, sendo observado de maneira geral pela presença de células do processo inflamatório tais como neutrófilos, eosinófilos, macrófagos, linfócitos, plasmócitos. A presença de tais eventos foi ranqueada quanto à aparição em 0 (ausente), 1 (leve), 2 (médio), 3 (intenso)⁵.

Análise estatística

O tamanho amostral foi definido baseado em resultados de um estudo piloto. Para determinar isso, o evento inflamação como desfecho primário foi considerado com um poder de estudo de 80% e um erro alfa de 5%. Como as variáveis eram ordinais, os dados foram analisados utilizando o teste estatístico de Kruskall-Wallis, seguido do teste de Dunn para os casos em que a diferença estatística foi detectada. O software GraphPad (San Diego, CA, USA) foi utilizado para os ensaios estatíticos. As diferenças entre as médias foram consideradas significativas quando p <0,05.

Resultados

A partir da análise histopatológica das áreas submetidas ao contato com os materiais em estudo, verificou-se que em nenhum dos grupos ocorreu

atrofia epitelial (dados não mostrados). Quanto à hipertrofia epitelial, foi observada maior ocorrência nos grupos 3 e 4 em relação ao grupo 1 (p <0,05). O grupo 2 não apresentou diferença estatística em relação aos demais grupos (Figura 1). Em relação à formação de cones epiteliais, foi observada presença no grupo 4 em relação aos grupos 1 (p <0.001) e 2 (p <0.05), não sendo observada essa diferença quando comparado ao grupo 3. Já o grupo 3 apresentou-se semelhante aos grupos 1 e 2 (Figura 2). Em relação ao processo inflamatório, foi observado de maneira mais intensa no grupo 4 em relação aos grupos 1 (p <0.01) e 2 (p <0.05), não sendo observada diferença estatística quando comparado ao grupo 3. Não foi observada diferença estatística entre os grupos 1, 2 e 3 (Figura 3).

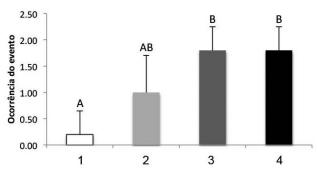


Figura 1 – Hipertrofia epitelial

Fonte: todas as figuras são de elaboração dos autores com base nos dados da pesquisa.

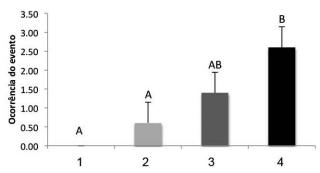


Figura 2 – Cones epiteliais

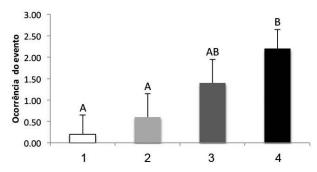


Figura 3 – Processo inflamatório

Discussão

Os agentes clareadores disponíveis no mercado apresentam na composição peróxido de carbamida ou peróxido de hidrogênio. Com diferentes marcas, as concentrações podem variar de 6% a 38%, dependendo da indicação e do protocolo do tratamento. O peróxido de hidrogênio foi introduzido como solução desinfetante e irrigadora dental por Harlan em 1884⁶, que observou que a substância também poderia ser utilizada como agente clareador de dentes escurecidos. No entanto, o clareamento de dentes com vitalidade pulpar utilizando o peróxido de hidrogênio só começou efetivamente a ser realizado no início do século XX⁷⁻⁹.

Gökay et al.¹¹ (2000) constataram que atualmente o agente clareador mais utilizado é o peróxido de hidrogênio, ou produtos que se desdobram em peróxido de hidrogênio, potencializando sua ação. É o caso do peróxido de carbamida que se decompõe em ureia e peróxido de hidrogênio. O peróxido de hidrogênio dissocia-se em água e oxigênio, e a ureia, por sua vez, decompõe-se em dióxido de carbono e amônia. Uma elevada concentração do peróxido de hidrogênio (30% a 35%) é conhecida por ser cáustica à mucosa oral, podendo ocasionar queimadura nos tecidos moles¹¹¹.

Estudos clínicos utilizando peróxido de carbamida com moldeiras em clareamento caseiro indicaram que 25% a 40% dos pacientes relataram irritação gengival durante o tratamento 12,13. Além disso, experimentos *in vivo* em animais demostraram que a exposição da gengiva ao peróxido de hidrogênio 1%, pelo período de 6 a 48 horas, resultou em um dano epitelial e uma resposta inflamatória aguda no tecido subcutâneo adjacente ao epitélio 14,15.

Tendo em vista a diversidade de protocolos de tratamento para o clareamento caseiro, neste trabalho selecionou-se o período de quinze dias de aplicação do agente clareador peróxido de carbamida 16%. Esse período e concentração foram selecionados por representarem parâmetros intermediários utilizados no tratamento de clareamento caseiro. O período de aplicação diária de 1 hora deveu-se ao risco ao qual seriam submetidos os animais em períodos superiores, uma vez que para a aplicação do agente clareador havia a necessidade de mantê-los sob anestesia geral.

A partir das análises histológicas realizadas, pôde-se observar que, com o aumento do período de exposição ao agente clareador, os eventos teciduais relacionados a uma resposta de proteção do organismo frente a um agente agressor também aumentaram, quando comparados ao grupo controle. Os achados em relação à hiperplasia epitelial corroboram com os achados de Weitzman et al. 15 (1986), que, ao estudar os efeitos da aplicação tópica duas vezes por semana de peróxido de hidrogênio a 30% sobre o epitélio oral de Syrian hamsters, observaram que todos os animais submetidos a tal tratamento apre-

sentaram hiperplasia epitelial. Ainda, em estudo de Albuquerque et al. 16 (2003), após a aplicação tópica de peróxido de carbamida a 10% por 20 minutos e durante três semanas sobre a mucosa oral de ratos Wistar, observaram que a aplicação do agente clareador induziu ao aumento na proliferação de células epiteliais, o que pode estar relacionado a um potencial carcinogênico.

Em relação a outro evento analisado neste estudo, é comum ocorrer uma hiperplasia da camada basal por aumento no número de células da camada basal da matriz, levando à formação de invaginações, chamadas cones epiteliais. Neste estudo, essa formação foi relacionada ao aumento do tempo de contato com o agente clareador. Tal dado corrobora com o aumento do nível inflamatório adjacente à camada epitelial dos animais, relacionado ao contato com o agente clareador. Em estudo de Alves et al. 17 (2008), ao estudarem o desenvolvimento de colesteatomas, uma associação positiva no aumento hiperplásico, formação de cones epiteliais e processo inflamatório foi encontrada, o que também foi encontrado no presente estudo.

Em relação ao processo inflamatório, estudos prévios demonstraram que fibroblastos e queratinócitos produzem citocinas pro-inflamatórias, como interleucina 1 e 6 (IL-1 e IL-6) quando em contato com peróxido de hidrogênio^{18,19}. O achado de que a expressão de ambas as citocinas é elevada em resposta à exposição a agentes clareadores sugere que esses agentes são capazes de induzir uma resposta associada à cascata inflamatória²⁰.

Com base nos dados obtidos no presente trabalho, conclui-se que com o aumento do período de contato do agente clareador, é observado o aumento na resposta inflamatória. Sugere-se que tal evento ocorra pela produção de citocinas pro-inflamatórias semelhantes às descritas por Terunuma et al. (2001) e por Cornelissen et al. (2009)^{18,19}.

Conclusão

Com base nos achados deste estudo, podemos concluir que o agente clareador a base de peróxido de carbamida a 16% pode alterar diretamente a morfologia tecidual em ratos. As mudanças ocorridas estão relacionadas a uma proteção da mucosa oral por meio da hipertrofia e formação de cones epiteliais e de um processo inflamatório mais evidente nos grupos 3 e 4, quando se usou o gel clareador por dez e quinze dias, respectivamente. Assim, sugerese que a exposição da mucosa oral a esses produtos pode predispor esses tecidos a alterações e riscos elevados.

Abstract

Objective: This study aims to assess the marginal gingiva of mice subjected to contact with carbamide peroxide, simulating at-home bleaching techniques. Materials and method: 20 mice were divided into four groups: three groups with different times of application of 16% carbamide peroxide bleaching agent, and a control group. The animals were sacrificed according to the times established, and mandible removal at the corresponding height of the central incisor involving the gingival mucosa of the area was fixed and processed for the production of histological sections and histomorphometric analysis of the area. Results: The analysis of results showed higher epithelial cone formations, hyperplasia, and inflammation in groups where the whitening gel was applied for 10 and 15 days than the control group. Conclusion: Based on the findings of this study, it may be concluded that bleaching agents can directly change tissue morphology, and exposing oral mucosa to these products can predispose the tissues to significant adverse risks.

Keywords: Carbamide peroxide. Gingival mucosa. Mice.

Referências

- Haywood VB, Heymann HO. Nightguard vital bleaching. Quintessence Int 1989; 20(3):173-6.
- Lucier RN, Etienne O, Ferreira S, Garlick JA, Kugel G, Egles C. Soft-tissue alterations following exposure to toothwhitening agents. J Periodontol 2013; 84(4):513-9.
- 3. Haywood VB, Heymann HO. Nightguard vital bleaching: how safe is it? Quintessence Int 1991; 22(7):515-23.
- Haywood VB. Nightguard vital bleaching: current concepts and research. J Am Dent Assoc 1997; 128 (Suppl):19S-25S.
- Scarparo RK, Haddad D, Acasigua GA, Fossati AC, Fachin EV, Grecca FS. Mineral trioxide aggregate-based sealer: analysis of tissue reactions to a new endodontic material. J Endod 2010; 36(7):1174-8.
- Harlan AW. Proceedings of Dental Societies American Dental Association-Twenty-third Annual Session. Dent Cosmos 1884; 26(1):97-8.
- 7. Fisher G. The bleaching of discolored teeth with HO. Dent Cosmos 1911; 53(2):246-7.
- 8. Prinz H. Recent improvements in tooth bleaching. Dent Cosmos 1924; 66(5):558-60.
- Ames JW. Removing stains from motlledenamel. J Am Dent Assoc 1937; 24(10):1674-7.
- Gökay O, Yilmaz F, Akin S, Tunçbilek M, Ertan R. Penetration of the pulp chamber by bleaching agents in teeth restored with various restoratives materials. J Endod 2000; 26(2):92-4.
- Naik S, Tredwin CJ, Scully C. Hydrogen peroxide toothwhitening (bleaching): Review of safety in relation to possible carcinogenesis. Oral Oncol 2006; 42(7):668-74.
- Leonard RHJr, Haywood VB, Phillips C. Risk factors for developing tooth sensitivity and gingival irritation associated with nightguard vital bleaching. Quintessence Int 1997; 28(8):527-34.
- 13. Tam L. Clinical trial of three 10% carbamide peroxide bleaching products. J Can Dent Assoc 1999; 65(4):201-5.

- 14. Martin JH, Bishop JG, Guentherman RH, Dorman HL. Cellular response of gingiva to prolonged application of dilute hydrogen peroxide. J Periodontol 1968; 39(4):208-10.
- 15. Weitzman SA, Weitberg AB, Stossel TP, Schwartz J, Shklar G. Effects of hydrogen peroxide on oral carcinogenesis in hamsters. J Periodontol 1986; 57(11):685-8.
- 16. Albuquerque RC, Gomez RS, Dutra RA, Vasconsellos WA, Gomez RS, Gomez MV. Efeito do agente clareador contendo peróxido de carbamida a 10% na proliferação do epitélio oral de ratos. Braz Dent J 2002; 13(3):162-5.
- 17. Alves AL, Pereira CSB, Ribeiro FAQ, Fregnani JHTG. Analysis of histopathological aspects in acquired middle ear cholesteatoma. Rev Bras Otorrinolaringol 2008; 74(6):835-
- 18. Terunuma A, Aiba S, Tagami H. Cytokine mRNA profiles in cultured human skin component cells exposed to various chemicals: a simulation model of epicutaneous stimuli induced by skin barrier perturbation in comparison with that due to exposure to haptens or irritant. J Dermatol Sci 2001; 26(2):85-93.
- 19. Cornelissen LH, Bronneberg D, Bader DL, Baaijens FP, Oomens CW. The transport profile of cytokines in epidermal equivalents subjected to mechanical loading. Ann Biomed Eng 2009; 37(5):1007-18.
- 20. Mueller MM. Inflammation in epithelial skin tumours: Old stories and new ideas. Eur J Cancer 2006; 42(6):735-44.

Endereço para correspondência:

Gerson Acasigua Faculdade de Odontologia Universidade Federal do Rio Grande do Sul Rua Ramiro Barcelos, 2.492, sala 503 90610-000 Porto Alegre, RS Brasil Fone: (51) 3308-5024

E-mail: gacasigua@yahoo.com.br

Recebido: 04/11/15. Aceito: 07/01/16.