

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
BIOQUÍMICA TOXICOLÓGICA**

**EFEITO DO PERÓXIDO DE CARBAMIDA
E DOS METAIS PRESENTES NO AMÁLGAMA DENTAL
SOBRE A ATIVIDADE DA δ -ALA-D HEPÁTICA
(E. C.: 4.2.1.24), E OS NÍVEIS DE
PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA EM RATOS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Fernanda Neisse

Santa Maria, RS, Brasil

2006

**EFEITO DO PERÓXIDO DE CARBAMIDA E DOS METAIS
PRESENTES NO AMÁLGAMA DENTAL SOBRE A ATIVIDADE
DA δ -ALA-D HEPÁTICA (E. C.: 4.2.1.24), E OS NÍVEIS DE
PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA EM RATOS**

por

Fernanda Neisse

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Área de Concentração em Bioquímica Toxicológica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial pra obtenção do grau de **Mestre em Bioquímica Toxicológica.**

Orientador: Prof. João Batista Teixeira da Rocha

Santa Maria, RS, Brasil

2006

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Naturais e Exatas
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas
Bioquímica Toxicológica**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**EFEITO DO PERÓXIDO DE CARBAMIDA E DOS METAIS PRESENTES NO
AMÁLGAMA DENTAL SOBRE A ATIVIDADE DA δ -ALA-D HEPÁTICA (E. C.:
4.2.1.24), E OS NÍVEIS DE PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA EM RATOS**

elaborada por
Fernanda Neisse

Como requisito parcial para a obtenção do grau de
Mestre em Bioquímica Toxicológica

COMISSÃO EXAMINADORA:

**João Batista Teixeira da Rocha, Dr.
(Orientador)**

Vânia Lucia Pimentel Vieira, Dr. (UFSM)

Bernardo Baldisserotto, Dr. (UFSM)

Santa Maria, 29 de abril de 2006.

Dedico este trabalho à minha querida mãe,
Zelita,
grande responsável por eu estar aqui.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida, pela fé, pela esperança...

À minha mãe Zelita, que em muitas ocasiões renunciou às suas próprias realizações para vivenciar cada momento do meu caminho rumo aos meus ideais, não permitindo assim, que as dificuldades me atingissem durante minhas conquistas. Agradeço profundamente pelo sacrifício despendido em minha educação, e pelo amor incondicional, que contribuíram determinantemente para minha formação.

Ao meu irmão Ricardo, pelo exemplo de coragem e determinação com os quais sempre encarou sua vida pessoal e profissional, além de em todos os momentos se fazer presente, ainda que a distância física entre nós seja enorme.

Ao meu namorado, Geancarlo, por apoiar e incentivar minha realização profissional. Agradeço por estar sempre ao meu lado. Para você o meu amor.

Ao Prof. João Batista Teixeira da Rocha, pela oportunidade que me deu de realizar o curso de pós-graduação sob sua orientação, pelos conhecimentos e experiências, pela confiança em mim depositada, minha gratidão e admiração.

À Prof. Cristiane Cadermatori Danesi, do Departamento de Patologia da Universidade Federal de Santa Maria, por ter gentilmente permitido a utilização do laboratório da Área, bem como os equipamentos necessários para a realização desta pesquisa.

À Prof. Gisele Rovani, do Departamento de Patologia da Universidade de Passo Fundo, pelo auxílio na interpretação e análise das lâminas histológicas, sempre atenciosa em todos os momentos em que solicitamos sua preciosa contribuição.

Ao Prof. Sérgio Silveira, do Departamento de Morfologia da Universidade de Santa Maria, pela paciência, atenção e simpatia demonstradas durante a realização das lâminas histológicas.

Aos demais professores e amigos do Setor de Bioquímica da UFSM, pela amizade e compreensão.

À colega Taciane Roza, pela amizade, pelo incentivo, e pela ajuda quando comecei a trabalhar em pesquisa.

À amiga e colega Maele pelo companheirismo, pelo convívio sempre amistoso, e principalmente pela amizade construída.

À minha querida amiga Viviane Cunha, que sempre paciente me deu forças e apoio, colega que sempre pude contar, muito obrigada.

Aos colegas da pós-graduação que sempre com carinho me auxiliaram nas tarefas infindáveis, proporcionando-me cumprir todos os compromissos...Muito obrigada!

À Angélica Balconi Moro, da secretaria da pós-graduação, pela presteza e amizade.

À todos que, de alguma forma, contribuíram e não forma citados, mas nem por isso esquecidos.

**“ É exatamente a vida,
que aguçando a nossa curiosidade,
nos leva ao conhecimento;
É o direito de todos à vida que nos faz solidários;
É a opção pela vida que nos torna éticos.”**

Paulo Freire

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas
Universidade Federal de Santa Maria

EFEITO DO PERÓXIDO DE CARBAMIDA E DOS METAIS PRESENTES NO AMÁLGAMA DENTAL SOBRE A ATIVIDADE DA δ -ALA-D HEPÁTICA (E. C.: 4.2.1.24), E OS NÍVEIS DE PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA EM RATOS

AUTORA: FERNANDA NEISSE

ORIENTADOR: JOÃO BATISTA TEIXEIRA DA ROCHA

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 06 de maio de 2006.

O clareamento dental é um procedimento estético que usualmente é realizado através de produtos contendo o peróxido de carbamida, que possui potencial efeito deletério mediado pela formação do peróxido de hidrogênio. O amálgama dental ainda tem sido amplamente utilizado para restaurações em dentes posteriores, apesar das controvérsias devido ao seu conteúdo de mercúrio. O peróxido de hidrogênio gerado através dos agentes clareadores tem sido considerado por aumentar a liberação de íons metálicos quando em contato com as restaurações de amálgama, porém existem poucos estudos a respeito dos efeitos tóxicos sinérgicos destes produtos. O objetivo do presente estudo foi investigar os possíveis efeitos do peróxido de carbamida *in vivo* após a administração oral, e *in vitro*, assim como dos metais presentes no amálgama dental. Os parâmetros estudados para a caracterização da toxicidade foram a atividade da δ -aminolevulinato desidratase (δ - ALA-D) hepática, os níveis de substâncias reativas com o ácido 2-tiobarbitúrico (TBARS) no fígado, cérebro, rim e na polpa dental de ratos, além do efeito tópico sobre a mucosa do palato, a qual foi investigada por estudo histológico. *In vivo*, a exposição ao peróxido de carbamida não modificou os níveis de TBARS no fígado ou na polpa dental, e também não alterou a atividade da δ - ALA-D hepática. Entretanto, apenas o peróxido de carbamida a 35% provocou um aumento na espessura do epitélio, o qual foi associado com um aumento no número de camadas celulares epiteliais, e um aumento na dimensão da camada celular epitelial basal. O peróxido de carbamida produziu um aumento significativo na produção de TBARS *in vitro* quando testado em concentrações extremamente altas no fígado, no cérebro e polpa dental. CuSO_4 e SnCl_2 produziram um decréscimo significativo nos níveis de TBARS no fígado quando testados em concentrações de 100 and 200 μM . Por outro lado no cérebro, 100 μM CuSO_4 causou um aumento na produção de TBARS. Na polpa dental, 100 and 200 μM HgCl_2 causaram um aumento na produção dos níveis TBARS. Quando os metais constituintes do amálgama e o peróxido de carbamida dissolvido em carbopol foram incubados concomitantemente, carbopol e 200 μM SnCl_2 diminuíram significativamente a produção de TBARS no cérebro. Carbopol, o veículo em gel, causou um decréscimo na produção de TBARS em todos os tecidos. Concluindo, o peróxido de carbamida, o CuSO_4 e o HgCl_2 demonstraram capacidade pró-oxidativa sobre os tecidos. Portanto, é necessária uma atenção especial quando o clareamento é realizado em dentes com restaurações de amálgama, pois o tecido pulpar pode ser subjulgado pela atividade tóxica concomitante destas substâncias.

Palavras-chave: peróxido de carbamida, peróxido de hidrogênio, clareamento dental, δ -ALA-D, TBARS.

ABSTRACT

Tooth bleaching is an aesthetic procedure that is usually carried out with products containing carbamide peroxide, which has a potential deleterious effect mediated by hydrogen peroxide formation. Dental amalgam has still been widely used for posterior teeth restorations, despite its mercury content. There is concern that hydrogen peroxide generated from bleaching agents can cause enhanced metal ion release from dental amalgam restorations when in contact, but there are few studies about the synergistic systemic toxic effects of these products. The aim of the present study was to investigate the possible toxic effects of carbamide peroxide *in vivo* after oral administration, and *in vitro*, as dental amalgam metals toxicity. The parameters studied for characterization of toxicity were hepatic δ -aminolevulinatase (δ - ALA-D) activity, 2-thiobarbituric acid-reactive substance (TBARS) levels in liver, brain, kidney and dental pulp of rats, and in addition the topic effect over palatal mucosa, which was investigated by histological study. *In vivo*, exposure to carbamide peroxide did not change TBARS levels in liver and dental pulps, or liver δ - ALA-D activity. However, only the 35% carbamide peroxide treatment provoked an increase in the epithelium thickness, which was associated with an elevation in the number of epithelium cell layers, and an elevation in epithelium basal cell layer dimension. Carbamide peroxide produced a significant increase in TBARS production *in vitro* when tested at extremely high concentrations in liver, brain and dental pulp. CuSO_4 and SnCl_2 produced a significant decrease in liver TBARS levels when tested at concentrations of 100 and 200 μM . Otherwise in brain, 100 μM CuSO_4 caused an increase in TBARS production. In dental pulp, 100 and 200 μM HgCl_2 caused an increase in TBARS levels production. When amalgam metals constituents and carbamide peroxide dissolved in carbopol were incubated together, carbopol and 200 μM SnCl_2 significantly decreased brain TBARS production. Carbopol, the gel vehicle, caused a decreased TBARS production in all tissues. In conclusion, carbamide peroxide, CuSO_4 and HgCl_2 were found to have some pro-oxidant activity over tissues. Therefore, care is needed when bleaching treatment is performed in amalgam restored teeth, because pulp tissue may be overwhelmed by the concomitant toxic activity of these substances.

Key-words: carbamide peroxide, hydrogen peroxide, dental bleaching, δ -ALA-D, TBARS.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Níveis de TBARS hepático após incubação com peróxido de carbamida e gel carbopol <i>in vitro</i>	54
Figura 2 – Níveis de TBARS pulpar após incubação com peróxido de carbamida e gel carbopol <i>in vitro</i>	54
Figura 3 – Atividade da δ -ALA-D hepática de animais submetidos ao tratamento com gel carbopol, peróxido de carbamida 24% e 35%.....	55
Figura 4 – Níveis de TBARS hepático de animais submetidos ao tratamento com gel carbopol, peróxido de carbamida 24% e 35%.....	56
Figura 5 – Níveis de TBARS pulpar de animais submetidos ao tratamento com gel carbopol, peróxido de carbamida 24% e 35%.....	56
Figura 6 – Níveis de TBARS hepático após a incubação com os metais constituintes do amálgama dental <i>in vitro</i>	75
Figura 7 – Níveis de TBARS cerebral após a incubação com os metais constituintes do amálgama dental <i>in vitro</i>	76
Figura 8 – Níveis de TBARS renal após a incubação com os metais constituintes do amálgama dental <i>in vitro</i>	77
Figura 9 – Níveis de TBARS pulpar após a incubação com os metais constituintes do amálgama dental <i>in vitro</i>	78
Figura 10 – Níveis de TBARS produzidos pelo efeito do gel carbopol e do peróxido de carbamida sobre os tecidos hepático, cerebral e renal <i>in vitro</i>	79
Figura 11 – Níveis de TBARS produzidos pelo efeito do peróxido de carbamida sobre os tecidos hepático, cerebral e renal <i>in vitro</i>	80

Figura 11 – Níveis de TBARS produzidos pelo efeito do peróxido de carbamida e dos metais componentes do amálgama dental sobre os tecidos hepático, cerebral e renal *in vitro*.....81

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Quantificações do tecido epitelial do palato de animais submetidos ao tratamento com gel carbopol, peróxido de carbamida 24% e 35%.....57

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AgNO₃ – nitrato de prata

ALA – ácido delta-aminolevulínico

δ-ALA-D – delta aminolevulinatodesidratase

ATP – adenosina trifosfato

°C – graus Celcius

CuSO₄ – sulfato de cobre

DNA – ácido desoxirribonucléico

DTNB - ácido 5,5 – ditio-bis(2-nitrobenzóico)

DTT - ditioneitol

EDTA – ácido etileno di-amino tetra-acético

ERO – espécies reativas de oxigênio

GABA - ácido-γ-aminolevulínico

GPx – glutationa peroxidase

H₂O₂ – peróxido de hidrogênio

HgCl₂ – cloreto de mercúrio

PC – peróxido de carbamida

PCNA - expressão imunohistoquímica do antígeno nuclear de proliferação celular

PH – peróxido de hidrogênio

RNA – ácido ribonucléico

TBARS – substâncias reativas com o ácido 2-tiobarbitúrico

SH – grupamentos sulfidrílicos ou tióis

SnCl₂ – cloreto de estanho

SOD – superóxido dismutase

ZnCl₂ – cloreto de zinco

LISTA DE ANEXOS E APÊNDICES

ANEXO 1 – Comprovante aprovação comitê de ética.....	96
--	----

SUMÁRIO

RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	ix
LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	x
LISTA DE TABELAS.....	xii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	xiii
LISTA DE ANEXOS E APÊNDICES.....	xv
SUMÁRIO.....	xvi
INTRODUÇÃO.....	18
1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
1.1 Clareamento Dental.....	19
1.2 Formação de Radicais Livres.....	23
1.3 Delta Aminolevulinato Desidratase.....	26
1.3.1 – Histórico e função.....	27
1.3.2 – Características estruturais.....	27
1.3.3 – Importância toxicológica.....	28
1.4 Amálgama Dentário.....	30
2 OBJETIVOS.....	34
2.1 Objetivo Geral.....	34
2.2 Objetivos Específicos.....	34
3 ARTIGOS.....	36

3.1 Carbamide peroxide induces epithelial palatal hyperplasia but does not increase TBARS production <i>in vivo</i> in rats.....	36
3.2 Carbamide peroxide and dental amalgam metals effect in TBARS production in liver, brain, kidney and pulp of rats <i>in vitro</i>	58
4 CONCLUSÕES.....	82
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	84
ANEXOS.....	96

INTRODUÇÃO

Na estética, contexto mais atual da Odontologia, verifica-se a grande demanda de pacientes interessados em clarear e remover pigmentações dentárias, objetivando a obtenção de um sorriso com dentes saudáveis e brancos. Este anseio faz com que pacientes e cirurgiões-dentistas utilizem técnicas e produtos que clareiem os dentes, especialmente os dentes vitais (HAYWOOD & HEYMANN, 1989). A preocupação com a técnica de clareamento dental ministrada pelo paciente relaciona-se ao fato de a substância branqueadora ficar em constante contato com os tecidos duros e moles da boca, possibilitando também a ingestão acidental do produto (CHRISTENSEN, 1989).

Além do risco imposto pelos clareadores dentais, por tratarem-se de substâncias que induzem um processo de oxidação nos tecidos orais, ainda devem ser consideradas as restaurações de amálgama dental que também podem ser submetidas à ação destes agentes (ROTSTEIN *et al.*, 2000). Este material vem sendo utilizado há mais de 150 anos na odontologia restauradora, apesar das controvérsias existentes quanto à sua segurança devido à presença do mercúrio em sua composição (CLARKSON *et al.*, 2003).

Poucas pesquisas existem para assegurar a utilização, dosagens e indicação precisa destes componentes, baseadas na mensuração dos efeitos dos clareadores dentais a curto e longo prazos, assim como no potencial sinérgico destes agentes com os demais componentes presentes na cavidade oral.

Estes questionamentos, portanto, motivam o presente estudo, visando pesquisar os efeitos, riscos e indicações existentes para a técnica de clareamento de dentes.

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 - CLAREAMENTO DENTAL

Na história da humanidade, os dentes são e continuarão sendo sinal de saúde e beleza. É inquestionável o fato de que a estética dental é uma das áreas que mais vem sendo difundida, apesar de os profissionais da área odontológica há muito tempo estarem cientes da sua importância (POZZOBON, 1998). Em consequência, a área dos materiais odontológicos foi submetida a um grande avanço tecnológico, com o surgimento e a consagração de novas técnicas conservadoras, visando promover um sorriso harmônico, como é o caso das técnicas de clareamento dental. Estas técnicas têm o objetivo de devolver o aspecto natural tanto a dentes vitais quanto a dentes não-vitais que por algum motivo tiveram sua cor alterada, o que constitui um aspecto negativo sobre a estética do sorriso (BARATIERI *et al.*, 1993).

O clareamento dental tem sido relatado na literatura há mais de um século, e há a possibilidade de se optar por várias técnicas de tratamento, de acordo com o diagnóstico previamente estabelecido. As técnicas denominadas convencionais ou “in office” são aquelas realizadas somente no consultório e geralmente utilizam como agente clareador o peróxido de hidrogênio em concentrações de 30 a 35%. Estas substâncias possuem as mais variadas apresentações comerciais, quer sob a forma líquida, quer sob a forma de pó e líquido que, ao serem misturados formam um gel com dupla presa. A ativação pode ser realizada por reação química ou por fotoativação, através do uso de uma lâmpada fotopolimerizadora comum, o que confere à técnica praticidade e facilidade de execução (HAYWOOD, 1992).

Para o clareamento realizado pelo próprio paciente, sob a supervisão direta do cirurgião-dentista, denominada “técnica caseira supervisionada” ou “técnica da moldeira”, o agente clareador utilizado é o peróxido de carbamida em concentrações que variam de 10 a 22%, sendo que o mais utilizado e de fácil acesso é o peróxido de carbamida na concentração de 10% (HAYWOOD & HEYMANN, 1989).

O mecanismo básico de ação dos agentes clareadores é o mesmo, ou seja, ocorre através de uma reação de oxidação que atua diretamente sobre os pigmentos das estruturas dentais, fracionando-os e, como consequência, levando à obtenção do clareamento (GOLDSTEIN, 1989).

No contexto histórico, a literatura cita que em 1988, após a verificação de que alterações de cor principalmente na região ântero-superior constituíam um problema estético, foi descrita a seqüência clínica de uma técnica de clareamento para dentes vitais. Nesta técnica, o agente clareador utilizado era o peróxido de hidrogênio 35% associado ao uso complementar de uma “lâmpada clareadora”. Além do resultado estético satisfatório obtido, com esta técnica um grande número de dentes poderia ser clareado simultaneamente (SWIFT, 1988).

Em 1989 o peróxido de hidrogênio a 35% é considerado o agente clareador de referência, e por sua capacidade de penetração tanto em esmalte quanto em dentina, passa a ser utilizado na técnica convencional com ativação por luz e calor (GOLDSTEIN *et al.*, 1989). Nesta técnica convencional, realizada exclusivamente em consultório, o agente clareador é mais concentrado, sendo portanto utilizado geralmente em soluções ou preferencialmente na forma de gel. A apresentação em gel passou a ser utilizada por tornar mais fácil o controle de aplicação, limitando-o somente às áreas dentais desejadas (BARATIERI *et al.*, 1993).

Em 1989 também foi publicada uma nova opção de técnica para clareamento de dentes vitais que foi denominada de “Nightguard Vital Bleaching”. Nesta técnica a inovação está no uso de uma placa protetora de silicone macia e flexível, dentro da qual um agente clareador à base de peróxido de carbamida 10% é utilizado durante o período de sono noturno (HAYWOOD & HEYMANN, 1989). O peróxido de carbamida 10%, entretanto, apresenta algumas características próprias tais como o fato de ser muito instável em contato com tecidos ou saliva e se dissociar em peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (de 3 a 5%) e uréia (de 7 a 10%). Na seqüência, o peróxido de hidrogênio é degradado em oxigênio e água, enquanto a uréia degrada-se em amônia e dióxido de carbono. Foi acrescentado à formulação dos peróxidos de carbamida um polímero denominado carbopol, o que torna o agente clareador mais espesso, melhora sua aderência aos tecidos (HAYWOOD & HEYMANN, 1991), além de prolongar a

liberação de oxigênio em três a quatro vezes, atingindo períodos de uma a três horas de ação dependendo da concentração e das condições ambientais (SOUZA, 1993). No decorrer deste período de tratamento noturno, alguma quantidade de gel poderá ser liberada da moldeira, podendo ser ingerida, absorvida ou expectorada, o que pode gerar uma situação de risco para o paciente, dependendo da quantidade ou concentração administrada (CHRISTENSEN, 1989).

O estudo dos efeitos do peróxido de hidrogênio sobre os tecidos orais já vem sendo desenvolvido há bastante tempo, devido ao seu amplo emprego desde os primórdios da odontologia (DESESSO *et al.*, 2000). Em 1961, uma investigação sobre a ação do peróxido de hidrogênio sobre os tecidos da mucosa oral revelou um aumento nos índices mitóticos após a exposição destes tecidos durante 30 dias a uma solução a 30%. Além disso, o peróxido de hidrogênio também prolongou o período mitótico, especialmente a prófase (GARGIULO *et al.*, 1961).

No estudo onde foi empregado o tratamento com uso tópico da solução de peróxido de hidrogênio 1% em gengiva de cães, foi constatada a ocorrência de alterações histológicas danosas, que variaram de presença de vacúolos nas células do tecido epitelial e marcado edema no tecido conjuntivo, até completa destruição da camada córnea do tecido epitelial, além da presença de neutrófilos, linfócitos e plasmócitos no tecido conjuntivo (MARTIN *et al.*, 1968).

O estudo onde foi utilizado um tratamento com peróxido de hidrogênio 30% por duas vezes na semana, durante 22 semanas, demonstrou efeito sobre o epitélio de revestimento da cavidade bucal de hamsters. A substância provocou hiperkeratose e hiperplasia do tecido epitelial em 19 semanas. Não foi observado o desenvolvimento de carcinomas, entretanto, em 4 animais foi observada a presença de displasia epitelial. Com esses resultados, os autores concluíram que o peróxido de hidrogênio é uma substância capaz de induzir alterações patológicas, freqüentemente associadas com lesões cancerígenas (WEITZMAN *et al.*, 1986).

Em investigação sobre a ação dos agentes clareadores, foi verificado que produtos contendo peróxido de hidrogênio 25-35% ou peróxido de carbamida 10% provocam lesões nos tecidos gengivais e mucosa bucal, que se traduzem em inflamações crônicas ou lesões erosivas, muito freqüentemente localizadas nas papilas

interdentárias. Estas, ao serem analisadas microscopicamente mostraram áreas de necrose por coagulação, formação de abscessos, separação dos tecido epitelial e conjuntivo, além de perda das fibrilas colágenas. Verificou-se também que a aplicação de peróxido de hidrogênio a 30% sobre o epitélio gengival humano causa hiperplasia no tecido epitelial e aumento da atividade mitótica (LARSON, 1990).

A análise morfológica das mucosas tratadas em um trabalho experimental múltiplo com peróxido de carbamida 10% evidenciou um aumento da espessura do epitélio e da camada de ceratina, além do aparecimento de células epiteliais da camada espinhosa com inclusões claras em seu citoplasma. Por outro lado, o tecido conjuntivo não mostrou evidência de reação do tipo inflamatória (SOUZA, 1993).

Estudos utilizando peróxido de carbamida 10% em cultura de fibroblastos gengivais humanos concluíram que *in vitro* esse agente é tóxico, pois inibiu severamente as funções celulares. Entretanto, revelam que *in vivo* existem enzimas que quebram o peróxido de hidrogênio liberado por esses produtos, protegendo, assim, os tecidos da cavidade bucal e seus componentes celulares (TIPTON *et al.*, 1995). Estes mesmos pesquisadores também investigaram o papel da saliva e seus componentes (lactoperoxidase e mucina salivar) na modulação da toxicidade de agentes clareadores, em fibroblastos gengivais humanos, *in vitro*. Como resultados, deduziram que a toxicidade dos agentes clareadores é decorrente da presença de peróxido de hidrogênio em sua composição, e que as enzimas presentes na saliva e/ou tecidos bucais desempenham um papel fundamental na proteção da mucosa.

Em um estudo onde foi pesquisado o efeito do peróxido de carbamida 10% sobre a proliferação celular da mucosa lingual de ratos Wistar, através da expressão imunohistoquímica do antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA), foi observado que o uso tópico do mesmo também induz ao aumento do índice de proliferação da mucosa bucal (ALBUQUERQUE *et al.*, 1998).

Os efeitos dos agentes clareadores sobre as estruturas dentárias não são muito claros, e muitas controvérsias existem. Alguns investigadores não indicam grandes alterações nas superfícies dentárias quando estas estruturas são clareadas com peróxido de carbamida (COBANKARA *et al.*, 2004). Entretanto, vários estudos têm demonstrado alterações estruturais na superfície do esmalte (KAO *et al.*, 1991;

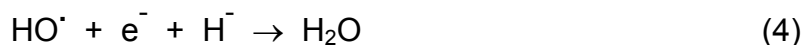
ZALKIND *et al.*, 1996; AKAL *et al.*, 2001; RODRIGUES *et al.*, 2005), dentina (ZALKIND *et al.*, 1996; RODRIGUES *et al.*, 2005) e restaurações (BAILEY & SWIFT JR., 1992; HUMMERT *et al.*, 1993; ROBERTELLO *et al.*, 1999; ROTSTEIN *et al.*, 2000; ATTIN *et al.*, 2004; YALCIN & GURGAN, 2005), quando submetidas aos clareadores dentais. O clareamento dental também provocou diminuição da dureza superficial do esmalte (AKAL *et al.*, 2001; RODRIGUES *et al.*, 2005), e diminuição da resistência de adesividade entre esmalte e resinas compostas (DISHMAN *et al.*, 1994; ATTIN, *et al.*, 2004).

A ação dos agentes clareadores sobre restaurações de amálgama foi relatada em uma revisão sobre o efeito destes sobre os diversos materiais restauradores. Alguns estudos laboratoriais registraram aumento na liberação de vapores de mercúrio quando restaurações de amálgama foram expostas à ação do peróxido de carbamida 10% por 8 horas, durante 14 a 28 dias. Entretanto, essa liberação de vapores variou de acordo com o tipo de amálgama e tipo de agente clareador utilizado (SWIFT & PERDIGÃO, 1998). A participação do peróxido de carbamida no aumento da liberação do mercúrio de restaurações de amálgama *in vitro* também foi documentada por ROTSTEIN *et al.*, 2000. Este aumento foi observado tanto superficialmente como no líquido circundante no qual foi armazenado, e a presença de um biofilme não impediu a liberação de grandes quantidades de mercúrio destas restaurações (HUMMERT *et al.*, 1993; ROTSTEIN *et al.*, 1997; STEINBERG *et al.*, 2003).

1.2 – FORMAÇÃO DE RADICAIS LIVRES

Radicais livres são espécies químicas capazes de existência independente e que contêm um ou mais elétrons não-pareados em sua órbita de valência (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1998). O oxigênio molecular em seu estado fundamental possui reatividade muito baixa e dois elétrons não-pareados, isto é, com spins paralelos (PRYOR, 1986). A redução do dioxigênio pode, entretanto, ocorrer através de reduções univalentes seqüenciais, de forma a evitar a restrição associada ao Princípio

de Exclusão de Pauli, de acordo com as seguintes reações (constituindo as chamadas formas intermediárias da redução parcial do oxigênio) (TRAVACIO & LLESUY, 1996):



Estas formas intermediárias caracterizam-se pela acentuada reatividade e são distintas do oxigênio no seu estado fundamental (PRYOR, 1986).

No processo respiratório tem-se a formação de espécies intermediárias instáveis de oxigênio, as chamadas Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) (em maior ou menor escala). As EROs são compostos que em sua maioria apresentam um tempo de vida incrivelmente fulgaz, da ordem de milésimos a bilionésimos de segundo. Entretanto, apesar da breve existência, possuem um certo instante de vida livre, no qual procuram adquirir estabilidade, reagindo com a matéria circundante (SIGNORINI & SIGNORINI, 1995).

No processo de transformações químicas, grande parte do oxigênio molecular é reduzido à água através das transferências de elétrons da cadeia respiratória. Estima-se que em torno de 98% do oxigênio consumido em organismos aeróbicos é reduzido de forma tetravalente até H_2O (CHANCE *et al.*, 1979), através da reação da citocromo c oxidase mitocondrial, sem a concomitante geração de ERO, permitindo que a principal via de transferência de elétrons e de energia para a síntese de adenosina trifosfato celular (ATP) participe apenas particularmente da citotoxicidade decorrente dessas formas deletérias (FRIDOVICH, 1979). Mesmo assim, o principal sítio de formação endógena do ânion superóxido estaria localizado na cadeia respiratória (BOVERIS & CHANCE, 1973), correspondendo a cerca de 2% do oxigênio consumido (CHANCE *et al.*, 1979; BOVERIS & CADENAS, 1982). A produção de ânion superóxido é diretamente proporcional ao volume de oxigênio consumido ao nível mitocondrial (BOVERIS & CHANCE, 1973; JONES, 1985; DE GROOT & LITTANER, 1989). O

superóxido formado então reage com o peróxido de hidrogênio na reação de Haber-Weiss, $O_2^- + H_2O_2 \rightarrow O_2 + OH^- + OH\cdot$, produzindo radical hidroxil ($OH\cdot$). Esta reação ocorre de maneira lenta em pH fisiológico (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1998).

O peróxido de hidrogênio, gerado essencialmente em mitocôndrias e peroxissomos, é uma molécula que a rigor não pode ser considerado um radical livre, pois não possui elétrons não pareados, apesar de sua atividade oxidante e elevada capacidade de difusão. Por esta característica de instabilidade, o peróxido de hidrogênio é de fácil decomposição, liberando água e oxigênio ($2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$) (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1998). Após atravessar as membranas celulares também poderá reagir com ferro e cobre presentes, formando radicais hidroxil ($OH\cdot$), que são radicais livres. Este fenômeno é denominado Reação de Fenton ($H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow Fe(III) + OH^- + OH\cdot$ ou $H_2O_2 + Cu^+ \rightarrow Cu^{2+} + OH\cdot$), e tem grande significado biológico devido à sua elevada reatividade e toxicidade (PRYOR, 1986; FRIDOVICH, 1986).

O radical hidroxil reage muito rapidamente com quase todo o tipo de molécula encontrada no interior das células, como açúcares, aminoácidos, fosfolípidios, bases do ácido desoxirribonucléico (DNA) e ácidos orgânicos. Entre os radicais livres, é considerado o mais reativo. Esta seqüência de eventos é que dá origem às reações em cadeia com os constituintes celulares, oxidando resíduos de aminoácidos produzindo bases de Schiff, podendo levar também a uma alteração química das bases púricas e pirimídicas quebrando a fita de DNA, além de danos a proteínas e a outras moléculas orgânicas (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1998).

A peroxidação lipídica é uma das principais conseqüências da ação dos radicais livres nas células. O dano causado por ela se manifesta pelas mudanças nas propriedades das membranas, como permeabilidade, viscosidade, modificação na interação lipídio-proteína e perda da atividade enzimática ligada à membrana ou solúvel no sistema (IVANOV, 1985).

Além da geração natural das ERO como conseqüência da cadeia respiratória, existem algumas condições favorecedoras da formação das mesmas, tais como exposição prolongada à radiação solar, tabagismo, ação de certos fármacos, entre eles o gel de clareamento dental (DAHLSTROM *et al.*, 1997; VAN OIJEN *et al.*, 1998).

Conforme previamente citado, o processo do clareamento dental ocorre devido à degradação do peróxido de carbamida em peróxido de hidrogênio como substância ativa. Este, por último, irá se degradar até a obtenção do clareamento dental, que ocorre através de uma reação de oxidação. A taxa da reação da degradação do peróxido de hidrogênio é dependente da concentração de peróxido de hidrogênio na cavidade oral e dos níveis de peroxidase salivar. O uso de uma baixa concentração de peróxido de hidrogênio no clareamento dental requer um aumento no tempo de exposição (SULIEMAN *et al.*, 2004). Quanto mais tempo levar para eliminar o peróxido de hidrogênio, maior o tempo de exposição às espécies reativas de oxigênio (SINENSKY *et al.*, 1995).

Como a substância clareadora permanece em contato com os dentes durante o período do tratamento, o peróxido de hidrogênio pode penetrar no esmalte e na dentina e se difundir através destes tecidos atingindo as estruturas mais vulneráveis como os prolongamentos odontoblásticos e a polpa dental (SEALE *et al.*, 1981; GOLDSTEIN *et al.*, 1989), assim como as enzimas pulpares (BOWLES & THOMPSON, 1986).

No estudo *in vitro* de SINENSKY *et al.*, 1995, foi comprovado que o peróxido de carbamida é capaz de reduzir os níveis intracelulares de glutatona reduzida. Em concentrações aumentadas, foi capaz de induzir a liberação da enzima lactato desidrogenase, o que indica seu poder no dano à integridade da membrana plasmática celular, já que esta é uma enzima intracelular.

1.3 - DELTA AMINOLEVULINATO DESIDRATASE

Como o gel utilizado na técnica do clareamento caseiro pode ser parcialmente ingerido pelo paciente, e o fígado é o principal órgão responsável pela biotransformação, podem ser observados neste órgão, mas não exclusivamente, vários efeitos tóxicos associados ao tratamento clareador (COMPORTI, 1989). É de interesse especial neste estudo a enzima hepática delta-aminolevulinato desidratase (δ -ALA-D), (E. C.: 4.2.1.24) a qual é uma importante metaloproteína que participa do processo de síntese dos compostos tetrapirrólicos.

1.3.1 - Histórico e função:

A enzima citoplasmática delta-aminolevulinato desidratase, também conhecida como porfobilinogênio sintase ou 5-aminolevulinato hidrolase foi isolada na década de 50 (DRESEL & FALK, 1953; GIBSON *et al.*, 1955). Esta enzima catalisa o segundo passo da via de biossíntese dos compostos tetrapirrólicos (CASTELFRANCO & BATLE, 1983). A reação envolve a condensação assimétrica de duas moléculas do ácido delta-aminolevulínico (ALA), com perda de duas moléculas de água, para formar o composto monopirrólico porfobilinogênio (GIBSON *et al.*, 1955; SHEMIM *et al.*, 1976; JAFFE *et al.*, 1992, JAFFE, 1995).

A reação catalisada pela δ -ALA-D faz parte da rota biossintética dos compostos tetrapirrólicos (corrinas, bilinas, clorofilas e hemes). A grande importância destes compostos reside no desempenho de papéis metabólicos importantes, principalmente como grupo prostético de proteínas. São compostos nitrogenados contendo quatro pirróis substituintes, covalentemente ligados formando um anel, freqüentemente complexado com um átomo de metal no centro (WARREN *et al.*, 1998; JAFFE, 2000). O grupo heme (ferroprotoporfirina) integra a estrutura das proteínas que desempenham importantes funções como: transporte e armazenamento de oxigênio (hemoglobina e mioglobina), transporte de elétrons (citocromo a, b e c), reações de hidroxilação de xenobióticos e esteróides (citocromo P450) e reações de oxi-redução (catalases, peroxidases e triptofano pirrolase) (TIMBRELL, 1991).

1.3.2 – Características estruturais:

Todas as enzimas δ -ALA-D isoladas até o momento requerem um íon metálico bivalente para estarem ativas, sendo em sua maioria inibidas por ácido etileno di-amino tetra-acético (EDTA). Apesar do alto grau de similaridade entre os genes da δ -ALA-D provenientes de diversos organismos, a enzima requer metais diferentes para sua ativação de acordo com a fonte. A δ -ALA-D proveniente de animais, leveduras e de algumas bactérias é uma enzima dependente de zinco (CHEN & NEILANDS, 1973;

FINELLI *et al.*, 1974), tendo sido demonstrado o envolvimento de resíduos de cisteína na união deste metal (DENT *et al.*, 1990; MITCHELL & JAFFE, 1993; SPENCER & JORDAN, 1994).

A δ -ALA-D, independente de sua fonte, é uma enzima de natureza sulfidrídica (SHEMIN, 1976; TSUKAMOTO *et al.*, 1979; BEVAN *et al.*, 1980), sendo, portanto, inibida por agentes bloqueadores de grupos sulfidrídicos, tais como N-etilmaleimida, iodoacetato (BATLLE *et al.*, 1967; CHAUDHRY *et al.*, 1976; TIGIER *et al.*, 1970; WILSON *et al.*, 1972; BARNARD *et al.*, 1977; SHIBATA & OCHIAI, 1977; TAMAI *et al.*, 1979; RODRIGUES, 1987), paracloromercuriobenzoato, monoiodoacetamida e ácido 5,5 – ditio-bis(2-nitrobenzóico) (DTNB) (BARREIRO, 1867; BATTLE *et al.*, 1967), e por metais pesados que possuam alta afinidade por grupamentos sulfidrídicos, tais como o chumbo, o cobre e o mercúrio (GIBSON *et al.*, 1955; WILSON *et al.*, 1972; FINELLI *et al.*, 1975; SHIBATA & OCHAI, 1977; TAMAI *et al.*, 1979; NELSON *et al.*, 1981; GOERING & FOWLER, 1984, 1985; GOERING *et al.*, 1986; RODRIGUES *et al.*, 1989, 1996; BORRALHO *et al.*, 1990; ROCHA *et al.*, 1993, 1995; EMANUELLI *et al.*, 1996). O efeito do chumbo como inibidor da δ -ALA-D parece estar relacionado com a substituição do zinco pelo chumbo (GOERING, 1993) e com alterações no pH ótimo da enzima (WIGFIELD & FARRANT, 1979). Outros dados demonstraram que a δ -ALA-D é a principal proteína que liga o chumbo em eritrócitos humanos e não a hemoglobina como se postulava anteriormente (BERGDAHL *et al.*, 1997).

1.3.3 – Importância toxicológica:

Devido a sua natureza tiólica, a enzima δ -ALA-D pode ser inibida por uma variedade de metais pesados e não metais que possuam a propriedade química de oxidar grupamentos –SH. Sabe-se que o prognóstico de pacientes que sofreram intoxicação por chumbo pode ser avaliado de acordo com a inibição da δ -ALA-D de eritrócitos e seu índice de reativação por ditiotreitól (DTT) (BONSIGNORE, 1966; NAKAO *et al.*, 1968; HERNEBERG *et al.*, 1970; MITCHELL *et al.*, 1977; MEREDITH *et al.*, 1979).

A inibição da δ -ALA-D pode prejudicar a rota biossintética do heme, resultando em conseqüências patológicas (SASSA *et al.*, 1989; GOERING, 1993). Além da produção insuficiente de heme, a inibição da δ -ALA-D pode resultar no acúmulo do substrato ALA no sangue, com conseqüente aumento na excreção urinária do mesmo. O acúmulo de ALA pode estar relacionado com a superprodução de espécies reativas de oxigênio (MONTEIRO *et al.*, 1989; PEREIRA *et al.*, 1992; BECHARA *et al.*, 1993). Numerosas observações clínicas têm associado o acúmulo de ALA com a patogênese das porfirias agudas (KAPPAS *et al.*, 1995). As porfirias podem resultar de uma desordem autossômica recessiva, ou podem ser adquiridas como ocorre em casos de intoxicação por chumbo. A porfiria por deficiência de δ -ALA-D é caracterizada por disfunções neuroviscerais, neuropatias e acúmulo excessivo do precursor porfirínico, o ALA (GRANICK, 1978).

Pesquisas demonstram que, em ratos, a oxidação aeróbica do ALA promove um aumento anormal no tamanho de mitocôndrias (HERMES-LIMA *et al.*, 1990). Em estudos feitos com eqüinos e roedores, o excesso de ALA induz a liberação do íon ferro da ferritina *in vitro*, iniciando um processo de peroxidação lipídica no baço e no fígado destes animais (OTEIZA *et al.*, 1994). Isto pode estar associado com o fato de que pacientes com porfiria intermitente aguda e que, por conseqüência, possuem elevadas concentrações de ALA no sangue, apresentam altos níveis eritrocitários de superóxido dismutase (SOD) e glutatona peroxidase (GPx).

O ALA gerado no fígado e medula óssea pode atravessar a barreira hematoencefálica, sendo distribuído pelo sistema nervoso central, além de outros órgãos (McGILLION *et al.*, 1974; 1975). Em nível neuroquímico, 1 μ M de ALA é capaz de inibir a liberação do neurotransmissor ácido- γ -aminolevulínico (GABA), assim como a sua ligação nos receptores localizados nas membranas sinápticas (BRENNAN & CANTRILL, 1979; BRENNAN *et al.*, 1980).

Estudos realizados por EMANUELLI *et al.* (2000) demonstraram que a administração intraestriatal de ALA induz convulsões e assimetria corporal. O ALA também demonstrou poder inibitório sobre a atividade da $\text{Na}^+ \text{K}^+$ ATPase de cérebro e eritrócitos de coelhos (BECKER *et al.*, 1971), além de diminuir a velocidade de condução de impulsos nervosos motores em camundongos (CUTLER *et al.*, 1979).

Assim, o aumento na concentração de ALA, devido à inibição da enzima δ -ALA-D pode acarretar em conseqüências patológicas inespecíficas, uma vez que a produção exagerada de espécies reativas de oxigênio pode atuar nos mais diferentes órgãos e compartimentos celulares dos organismos nos quais são gerados.

1.4 AMÁLGAMA DENTÁRIO

O amálgama dentário tem sido utilizado por mais de 150 anos e consiste de uma liga de aproximadamente 50% de mercúrio combinado com outros metais como prata, estanho, cobre, zinco e paládio. Desde sua introdução, tem sido fonte de controvérsia pelos consagrados riscos gerados pela presença do mercúrio (CLARKSON *et al.*, 2003). Assim como o mercúrio, cada um de seus outros componentes metálicos também pode ser tóxico, dependendo da forma em que se encontram (ROTSTEIN, 1996).

A toxicologia dos metais sempre esteve associada aos eventos a curto prazo. Atualmente, observam-se ocorrências toxicológicas a médio e a longo prazo, cujas manifestações estão associadas à quantidade de metal necessária para que células e órgãos manifestem efeitos toxicológicos. A toxicologia visa determinar as doses e os níveis teciduais e celulares de metal capazes de causar efeitos específicos. Embora a maioria dos metais afetem múltiplos órgãos ou sistemas, efeitos exclusivos sobre um determinado tecido ou órgão podem ser induzidos por um metal especificamente. A interação do elemento tóxico com metais essenciais, a formação de complexos metal-proteína, a idade e o estágio de desenvolvimento do organismo exposto, a forma química ou especiação do metal, os hábitos de vida e o estado imune do hospedeiro são alguns dos principais fatores que influenciam a toxicidade dos metais (NORDBERG, 1978; GOYER, 1996; FURST, 1998).

A presença do mercúrio na composição do amálgama dentário expõem os profissionais assim como os pacientes aos efeitos danosos deste metal (WHO, 1991; CLARKSON, 1997; KOSTYNIK, 1998). Trata-se de um elemento tóxico, não essencial e de efeito acumulativo (CLARKSON, 1972; 1997). O mercúrio pode sofrer várias

transformações metabólicas. No organismo humano, a oxidação do vapor de mercúrio inalado ocorre em parte nos eritrócitos, e após difusão, em outros tecidos. Esta oxidação ocorre sob influência da enzima catalase (MAGOS *et al.*, 1978).

Por ser o mercúrio elementar a forma mais volátil, a via respiratória é a mais importante quanto à sua captação, chegando a retenção do mesmo a 80% do vapor inalado (WHO, 1991). O metal nesta forma é completamente absorvido pelas membranas alveolares, devido às suas características de alta difusibilidade e solubilidade em lipídios (CLARKSON, 1972; WHO, 1991). Após absorvido, parte é oxidado a cátion bivalente, enquanto o restante permanece na corrente sanguínea e atravessa as barreiras hematoencefálica e placentária (CLARKSON, 1972). Apesar de a absorção gastrointestinal do mercúrio metálico líquido em ratos ser muito pequena (0,01%), em humanos foi verificada a presença de mercúrio no sangue após a ingestão acidental de vários gramas deste composto (WHO, 1991).

Como citado anteriormente, os níveis teciduais de mercúrio dependem da forma química à qual o indivíduo foi exposto. A deposição do vapor de mercúrio inalado sofre processo de oxidação, porém devido à sua lipossolubilidade, uma parte do vapor de mercúrio atravessa as membranas muito mais prontamente que o mercúrio bivalente, onde uma quantidade significativa de vapor entra no cérebro antes de ser oxidado (WHO, 1991). Estudos realizados em camundongos e macacos demonstram que quantidades significativas de mercúrio são transportadas para o cérebro após a exposição ao vapor de mercúrio elementar, chegando os níveis cerebrais de mercúrio a serem dez vezes maiores que após a exposição intravenosa a doses equivalentes de mercúrio mercúrico (WHO, 1991). Após a exposição crônica ao vapor de mercúrio, os efeitos tóxicos mais acentuados são os neurológicos (FRIBERG & VOSTAL, 1972).

O rim é o principal órgão de depósito de mercúrio, tanto após a administração de vapor de mercúrio metálico, quanto após a administração de sais inorgânicos de mercúrio, onde 50-90% da carga corporal do metal está contida neste órgão (WHO, 1991). O mercúrio encontra-se principalmente no córtex renal e nas células dos túbulos proximais (CLARKSON, 1972; ZALUPS & BARFUSS, 1990; ZALUPS, 1991). A principal fração do mercúrio ligado a proteínas renais, está combinada com metalotioneínas. Estas proteínas possuem baixo peso molecular e são ricas em cisteína. Esta última

característica lhes confere alta afinidade por metais, reduzindo assim a toxicidade intracelular destes (CLARKSON, 1972; ONOSAKA & CHERIAN, 1981; GOERING & FOWLER, 1985; QUIG, 1998; ASCHNER, 2001; SHANKER, 2001; PEIXOTO *et al.*, 2003).

A toxicidade do mercúrio poderia ser explicada, em grande parte, pela sua afinidade por grupos sulfidrilas (-SH) (VALLEE & ULMER, 1972; OEHME, 1978; GOYER, 1996). No interior das células, o metal pode ligar-se a uma variedade de sistemas enzimáticos, interferindo assim no metabolismo e funcionamento celulares (SALGADO *et al.*, 1987; WHO, 1991). Com menor afinidade, o mercúrio também pode se combinar com outros ligantes de importância fisiológica, como grupamentos fosfatos, carboxilas, amidas e aminas (WHO, 1991). Mesmo em baixas concentrações, o mercúrio pode inibir ou inativar diversas enzimas, podendo ser citadas aqui a Na⁺,K⁺-ATPase (CLARKSON, 1972), Ca²⁺-ATPase (FREITAS *et al.*, 1996), aspartato aminotransferase, alfa-hidroxiacetato desidrogenase, lactato desidrogenase, ornitina carbamiltransferase (HILL & SOARES, 1984) e δ-ALA-D (ROCHA *et al.*, 1993; 1995; PEIXOTO, 2000). Até o momento não foi verificado *in vivo* o alvo responsável pela iniciação da toxicidade deste metal, pois devido à natureza ubíqua dos grupamentos sulfidrilas nas proteínas, as associações do mercúrio com estas biomoléculas são inespecíficas (ROTSTEIN, 1971; WHO, 1991; CLARKSON, 1997).

Outros mecanismos possíveis de toxicidade estão relacionados à reação *in vitro* do mercúrio com moléculas de DNA e ácido ribonucléico (RNA) (EICHHORN & CLARK, 1963; GRUENWEDEL & DAVIDSON, 1996). O metal, além de induzir a quebras no DNA (CANTONI *et al.*, 1982; 1984a, b; CHRISTIE *et al.*, 1984; 1986), inibe os mecanismos de reparo (CANTONI & COSTA, 1983) e a síntese proteica (BAER, 1998). O mercúrio também provoca peroxidação lipídica e perda da viabilidade celular (STACEY & KLAASSEN, 1981; STACEY & KAPPUS, 1982). O rim, além de ser o órgão que sofre grande acúmulo de mercúrio, sofre reação auto-imune com conseqüente formação de anticorpos contra o tecido glomerular (WHO, 1991). O mercúrio divalente também pode atravessar a membrana das células nervosas através de canais de sódio e cálcio, podendo causar despolarização irreversível e, conseqüentemente, sérias disfunções neuronais (MIYAMOTO, 1983).

Por ser a liberação do vapor de mercúrio dependente do número e área superficial das restaurações de amálgama, contato oclusal, e outros fatores como mudanças de temperatura, bruxismo, escovação dentária ou mastigação, torna-se difícil determinar uma dose média diária de mercúrio liberada (WAHL, 2001). Além disso, a quantidade de mercúrio liberada pelas restaurações decresce com o passar do tempo (BERDOUSES *et al.*, 1995).

No trabalho de LOBNER & ASRARI (2003) foi comprovado que o amálgama dentário é tóxico em cultura de células neuronais pela liberação de zinco. Estes autores sugerem a realização de outros experimentos com o intuito de medir a concentração da liberação de cada metal do amálgama dentário e as possíveis conseqüências destes.

Os resultados deste estudo poderão vir a colaborar no entendimento dos efeitos tóxicos locais e sistêmicos provenientes da interação destes agentes de clareamento com os metais existentes no amálgama dental.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O propósito principal desta pesquisa é avaliar o possível efeito tóxico do peróxido de carbamida e componentes do amálgama dental sobre os tecidos hepático, cerebral, renal, pulpar e palatal de ratos, assim como verificar uma possível ação destas substâncias na atividade da δ -ALA-D hepática.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.2.1 Avaliar *in vitro* os efeitos do dano oxidativo do peróxido de carbamida sobre os tecidos hepático, cerebral, renal e pulpar, através da determinação de TBARS.

2.2.2 Avaliar *in vitro* por intermédio da determinação de TBARS, a ação do gel de peróxido de carbamida associado ao mercúrio (HgCl_2), cobre (CuSO_4), zinco (ZnCl_2), prata (AgNO_3) e estanho (SnSO_4), metais componentes da liga do amálgama dental, assim como a ação isolada destes últimos sobre os tecidos hepático, cerebral, renal e pulpar.

2.2.3 Avaliar *in vivo* as doses e concentrações de peróxido de carbamida utilizadas para o tratamento proposto, considerando sua possível toxicidade hepática, por determinação da atividade da δ -ALA-D.

2.2.4 Avaliar *in vivo* a intensidade do dano oxidativo hepático e pulpar em animais submetidos ao peróxido de carbamida no tratamento proposto nas concentrações usadas, por intermédio da determinação de TBARS.

2.2.5 Avaliar *in vivo* o possível dano tecidual ocasionado pelo contato do gel de clareamento através da avaliação histopatológica da mucosa do palato dos animais submetidos ao tratamento proposto.

Carbamide peroxide induces epithelial palatal hyperplasia but does not increase TBARS production *in vivo* in rats

Fernanda Neisse, Maele M. M. Patuzzi, Vanderlei Folmer, João B. T. Rocha
Departamento de Química, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil

Short title: **Effect of carbamide peroxide in male rats**

Corresponding author:

Fernanda Neisse
Departamento de Química, Centro de Ciências Naturais e Exatas
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil
Campus UFSM s/n – Camobi
97105-900
Fone: +5532208041
Fax: +5532208031
e-mail: feneisse@yahoo.com.br

Keywords: dental bleaching, carbamide peroxide, TBARS, δ -ALA-D.

Summary

Objectives: Dental bleaching is a treatment that commonly uses carbamide peroxide (CP) as active ingredient and has been administered at high concentrations. The aim of the present study was to investigate the possible toxic effects of CP *in vitro* and *in vivo* after oral administration.

Methods: Twenty-five Wistar rats were exposed to 35%, 24% CP and 1% carbopol gel via oral topic application for twenty-five days. The parameters studied for characterization of CP toxicity *in vitro* and *in vivo* were δ -aminolevulinatase (δ - ALA-D) activity and 2-thiobarbituric acid–reactive substance (TBARS) levels. The topic effect over palatal mucosa was also investigated by histological study.

Results: CP produced a statistically significant increase in TBARS production *in vitro* when tested at extremely high concentrations 73 and 100 mM (in liver) and 187 mM (in dental pulp). *In vivo*, exposure to CP did not change TBARS levels in liver and dental pulp, or δ - ALA-D activity in liver. However, only the 35% CP treatment provoked an increase in the epithelium thickness, which was associated with an elevation in the number of epithelium cell layers. 35% CP also caused an elevation in epithelium basal cell layer dimension and an elevation in the number of mast cells.

Conclusions: In our study, CP was found to have some pro-oxidant activity *in vitro*, but not *in vivo*. The *in vivo* treatment did not cause systemic toxic effects, but topically 35% CP showed a cell proliferating activity.

1. Introduction

Teeth whiteners are substances which are currently used by dentists for bleaching teeth and are available in a variety of commercial preparations at different concentrations of carbamide peroxide (CP) as 10, 16, or 35%. CP decomposes into urea, ammonia, carbon dioxide, and hydrogen peroxide (HP) – its main active ingredient.¹⁻² Carbopol is a water-soluble resin added to prolong the release of active peroxide and to improve shelf life.³ When is used for home bleaching, drops of tooth whitener are placed in a tray, which is worn overnight or up to 8 hours. Under clinical conditions, some tooth whitener may be swallowed, absorbed, or expectorated. Consequently, it has been recommended that home bleaching treatment cannot be continued for more than six weeks.⁴

HP, as a potential toxic reactive oxygen specimen, is mobile and can diffuse through the soft tissue to react with vulnerable parts of a cell. The slow breakdown of hydrogen peroxide in an environment containing ferric and ferrous ions will produce strongly reactive intermediary ions and oxygen, both probably contributing to the bleaching process.⁵

It is not known if exposure to HP can overwhelm human oral mucosal antioxidant defenses, but it is suggested by previous observations that short-term HP application produces increased mitotic activity and hyperplasia.⁶ Ingestion of large doses of commercial preparations of teeth whiteners may be acutely toxic and even fatal to female laboratory rats.⁷ HP was considered to induce pathologic changes frequently associated with neoplastic lesions.⁸ Other published studies have indicated that HP can injure dental pulp⁹ and its enzymes.¹⁰ Additionally, HP can cause gingival inflammation,¹¹ severe edema of the tongue and frenulum¹² and depress the microcirculation.¹³

The effects of bleaching agents on tooth structure are not clear and some controversy exists. Some investigators have indicated no major changes in teeth surface when teeth are bleached with CP.¹⁴ However, several studies have demonstrated some structural alterations on the surface of enamel,¹⁵⁻¹⁸ restorations,¹⁹⁻²¹ dentin,¹⁸ and consequently penetrate enamel and dentine.^{9, 22}

δ -Aminolevulinatase (δ -ALA-D) [EC 4.2.1.24] is an essential enzyme in most organisms, catalyzing the condensation of two molecules of 5-aminolevulinic acid (ALA) to form the monopyrrole porphobilinogen.²³ δ -ALA-D inhibition may impair heme biosynthesis and can result in accumulation of ALA, which has some pro-oxidant activity.²⁴

Literature data have proposed that the concentrations of CP and HP should be increased in order to reduce the treatment period.²⁵ Nevertheless, little is known about the systemic toxic effects of these compounds. Since the use of these over-the-counter products are increasing and that they can be occasionally swallowed by the patient or may remain in contact with the tissues for 3 to 8 hours, it becomes important to investigate the toxicity of high doses of CP in animal models. Here we used the activity of δ - ALA-D, an enzyme that is sensitive to pro-oxidant situations,^{26, 27} the thiobarbituric reactive substances, and histomorphometric quantifications as end points of toxicity.

2. Materials and Methods

2.1 Chemicals

The three prepared gels employed in the treatment of this study contain 24%, 35% CP and carbopol 1% (vehicle). CP was obtained from a heated mixture of HP (40%) and triturated urea (60%) under a 100°C water bath until CP crystals were obtained. After that, CP was mixed with 1% carbopol gel according to the group concentration and conditioned in a syringe. HP was obtained from Alfa Química (Brazil), urea and 1% carbopol gel from Galena (São Paulo, Brazil). 2-Thiobarbituric acid and 5-aminolevulinic acid were obtained from Sigma (St. Louis, MO, USA). Phosphoric acid was obtained from Nuclear. Acetic acid was obtained from Merck (Darmstadt, Germany). Trichloroacetic acid was obtained from Nuclear (Brazil), formalin from Belga Química (Santa Maria, RS, Brazil), and mercuric chloride from Reagen (Brazil).

2.2 *In vitro* assay

In vitro TBARS assays were conducted using teeth pulps and liver tissues homogenates. CP concentrations of 36, 73 and 110 mM were used for liver homogenates and concentrations of 62, 125 and 187 mM were used when teeth pulp homogenates and CP were incubated together.

2.3 Treatment and tissue preparation

Twenty five Wistar adult rats (aged 2 – 3 months and weighing about 220g) were purchased from the General Animal House of the Federal University of Santa Maria and transferred to our own breeding colony. They were maintained at controlled room temperature (20-25°C) under natural lighting conditions, with water and food (Nuvital-PR, Brazil). This experiment was conducted with the acceptance of the Santa Maria University Committee of Ethic for Animals.

Animals were placed randomly in control or experimental groups. Water and food were removed for 8 h after the administration of tooth whitener or carbopol gel. All groups were submitted to a gel application every day, at the same hour, and it was given a 200 µl dose of the gel directly in mouth by means of a syringe. One group of seven

animals was given 24% CP gel, the second group containing eleven animals was submitted to 35% CP gel, and the last group of seven animals was administered 1% carbopol gel. The treatment lasted 25 days.

At the end of the treatment period (24 h after the last administration) seven animals of each group were anesthetized with ether and killed by decapitation. A group of four animals, which were administered 35% CP peroxide gel, was killed fifteen days after the end of the treatment. Teeth and liver were quickly removed and placed on ice. Liver was homogenized in 10 volumes of 150 mM saline, containing 10 mM Tris-HCl (pH 7.0) with 10 up-and-down strokes at approximately 1200 rev/min in a Teflon-glass homogenizer. The liver homogenate was centrifuged at 800 X g using a refrigerated centrifuge for 10 minutes to give a supernatant fraction that was used in the enzyme and 2-thiobarbituric acid–reactive substance assays (TBARS). The pulp tissues of both central upper incisors were entirely used. The teeth were carefully opened with a diamond bur and each one was used in one tube. So, the pulp TBARS assay was done in duplicate.

Four animals were selected from control, 24% and 35% CP treatment for histological examinations. This part of the study included the four animal 35% CP treated group killed fifteen days after the end of the treatment. Palatal tissues of the animals were carefully removed with a scalpel blade, and were stored in individual vials containing 10% formalin until the inclusion in paraffin.

2.4 Enzyme assays

δ -ALA-D activity was assayed by the method of Sassa²⁸ by measuring the rate of product (porphobilinogen) formation except that 84 mM potassium phosphate buffer, pH 6.4, and 2.4 mM ALA were used.^{29, 30} All experiments were carried out after 10 min of pre-incubation. The reaction was started 10 min after the addition of the enzyme preparation by adding the substrate. Incubations were carried out for 1 h at 39 °C for the liver enzyme. The reaction product was determined using modified Ehrlich's reagent at 555 nm, with a molar absorption coefficient of $6.1 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ for the Ehrlich-PBG salt. δ -ALA-D requires sulfhydryl compounds such as dithiothreitol (DTT) for maximal activity.⁶⁰ For this reason, DTT was used in this study to activate the enzyme.

Lipid peroxidation products were evaluated as TBARS, and levels were determined according to Ohkawa *et al.*³¹ Briefly, the reaction mixture contained 200 μ l 8.1% SDS, 200 μ l low-speed supernatant fraction (S_1), or entirely dental rat pulp, 500 μ l 1.267 mol/l acetic acid, 270 mmol/l HCl, pH 3.5, and 500 μ l 0.8% TBA. TBARS were quantified by adding S_1 directly to the above reaction medium. Samples were incubated at 100 °C for 60 min and then centrifuged at 1000 \times g for 15 min at 4 °C. The amount of TBARS produced was measured at 532 nm, using MDA to construct standard curves.

2.5 Histomorphometric analysis

A total of sixteen biopsy specimens were obtained from the treated animals. Immediately following excision, specimens were fixed and after 12 h were routinely processed and embedded in paraffin wax; sixteen 4-5 μ m thick deparaffinized sections were stained with Toluidine blue (Merck, Darmstadt, Germany) according to Enerbäck,³² for routine light microscopic examination. All specimens were analyzed for epithelium thickness, keratin thickness, number of cell layers, mast cell number per field and first basal cell layer thickness (original magnification 400X).

2.6 Statistical analysis

The results are expressed as mean followed by standard error variation (S.E.). Data were analyzed by one-way ANOVA, followed by Duncan test. Differences among groups were considered to be significant when $p \leq 0.05$.

3. Results

3.1 Effect of carbamide peroxide in TBARS *in vitro*

Liver homogenates were incubated with gel carbopol (control group) and concentrations of 36, 73 and 110 mM CP. 73 and 110 mM CP caused a significant increase in TBARS production ($p < 0,05$; Fig. 1-A). However, only the highest concentration of CP used (187 mM) caused a significant increase in TBARS production in pulp tissue ($p < 0,05$; Fig. 1-B).

3.2 Effect of carbamide peroxide in liver δ -ALA-D activity and TBARS *in vivo*

CP treatment did not change δ -ALA-D activity in liver both in the presence and absence of DTT (Fig. 2). The treatment for 25 days with CP did not modify hepatic TBARS production and TBARS content of pulp (Fig. 3A-B).

3.3 Topic effect of carbamide peroxide on rat palatal mucosa

These results show that there was a significant elevation in epithelium thickness only in the group of animals that were killed 15 days after the last administration of 35% CP treatment ($p < 0,05$). This group also revealed a significant elevation in the number of epithelial cell layers when compared to control group ($p < 0,05$). Keratin thickness was not affected by carbopol or CP gel ($p > 0,05$). The group of animals submitted to 35%CP exhibited a significant elevation in the number of mast cells per field and a significant elevation in basal cell layer thickness in comparison to control ($p < 0,05$).

4. Discussion

Bleaching is an oxidation reaction whereby the substance to be bleached donates electrons to the bleaching agent, and it can be performed by any oxidizing agent. The at home-procedure employs CP as a vehicle for the delivery of HP, the product of its degradation (for instance, 10 % CP in the presence of water releases 3.5% HP).³³ A low concentration of HP requires an increase in exposure time, because the rate of the reaction $2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$ is dependent on the HP concentration and the levels of salivary peroxidase.

Superoxide (O^{2-}), a free radical intermediate, is unstable and then reacts with HP in the Haber-Weiss Reaction, $\text{O}^{2-} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{O}_2 + \text{OH}^- + \text{OH}$, producing the hydroxyl (OH) radical. This reaction occurs slowly at physiologic pH. Tolerability of side effects experienced when using tooth whitening products are believed to be dependent upon peroxide concentration versus contact time.²⁵

A study of the 10% and 16% CP gel effect on enamel surfaces showed that both treatments provoked enamel prism markings with exaggerated prism peripheries and mild to moderate prism core loss, but more prominent with 16% gel,³⁴ which is in accordance with other studies that showed enamel surface alteration after CP treatment.^{17, 35} Anyway, it is important to consider the clinical significance of these enamel modifications because microscopically, bleaching generally results in less mineral loss than cola beverages consumption³⁶ and it is insignificant compared with mineral loss caused by microabrasion or adhesive techniques.³⁷

In an *in vitro* study using extracted human teeth, it was verified that pulp chamber penetration of CP exist, and the amount is proportional to the concentration of the bleaching agent.³⁸ Other study concluded that thinner layers of tooth structure may permit increased hydrogen peroxide penetration; and the longer the solution is in contact with the enamel surface, the deeper the penetration and the greater the quantity of solution to penetrate.³⁹ In the present study, CP influenced rat dental pulp only under *in vitro* experiments and only under at significant high concentrations (Fig. 2).

The tooth permeability to these agents may explain side-effects, such as tooth sensitivity, that results in a reversible pulpitis because of chemical irritation produced by

hydrogen peroxide.⁶ However one possible mechanism by which the pulp may protect itself from HP is through enzymatic breakdown of the molecule by pulp peroxidase (EC 1.11.1.7)⁴⁰ and catalase (EC 1.11.1.6).⁴¹ Nevertheless, in contrast to other enzymes, peroxidases can be inhibited by their substrate HP.⁴² Under *in vitro* situations, the toxic potency of bleaching materials could be reduced by treatment with peroxidase.⁴³ Catalase transforms two molecules of HP into two molecules of H₂O and O₂.⁴⁴ Additionally, it was demonstrated that pulp cells are capable of producing an enzyme called haeme-oxygenase-1, which is an important defensive enzyme under conditions of oxidative stress. This is specially found in odontoblasts and endothelial cells, subjacent to the areas of bleached enamel.⁴⁵ The 24 and 35% CP can be considered an elevated concentration treatment but it is not possible to measure the exact concentration in pulp tissue. We suggest that the passage from enamel to pulp may result in a diminished HP concentration.⁵⁹

Liver is the main body detoxifying organ and δ -ALAD is an important liver enzyme and catalyzes the second step in the heme biosynthetic pathway.²⁸ This enzyme is very sensitive to pro-oxidant agents or situations.⁴⁶ There are no previous studies that investigate a possible action of CP on this enzyme. Our data indicated that carbopol gel or CP gel did not change δ -ALA-D activity (Fig. 2) or liver TBARS levels (Fig. 3A-B).

HP is a substance that can be neutralized by a diversity of conditions. HP degradation may occur clinically from oral bacterial catalase,⁴⁷ and also, some of the peroxides normally present in mouth may react with salivary peroxidase. All body cells contain these antioxidant enzymes, but the highest levels are found in the duodenum, liver, spleen, kidney, blood and mucous membranes.⁴⁴ Probably, in our study, CP was neutralized partially or totally by salivary peroxidases, gastric and gut catalase⁴⁸ and gut glutathione peroxidase (EC 1.11.1.9).⁴⁹⁻⁵²

In fact, CP was not a potential systemic toxic substance. However, it was topically toxic, which is certainly related to the fact that gel adhere to the oral mucosa resulting in local high concentrations of CP.

In practice, bleaching agents may come into direct contact with gingival epithelium and there are reports of clinical ulcerations caused by these agents,⁵³ which may have a latent period before coming apparent.⁵⁴ Fibroblasts are the predominant

cells in healthy gingival connective tissue and they play a major role in its maintenance. *In vitro* studies show toxic effects of peroxides to human fibroblasts. HP proved to cause loss of maturation, nuclear hyperchromatism, nuclear crowding and cell death of oral epithelial cells *in vitro*.^{55,56} Furthermore, HP is capable of altering the human oral epithelial cell cycle and morphology.^{57,58} Local side effects on oral soft tissues caused by peroxides released into the oral cavity from bleaching systems may include gum burning or erosions of the gingival and tooth sensitivity.^{6, 9, 53}

In our study, macroscopic evaluation of rat palatal portions did not show any visual alterations. Otherwise, after the histological process and analysis, we observed an elevation in basal first cell layer thickness after 35% CP treatment for twenty five days, which is in accordance with previous report.⁶ An increase in epithelium thickness may be attributed to an enlargement in cell dimension, an augmented space between them or by an elevation in cell layer number, signs that can be related to a toxic substance. Also, we can consider that the topic application of 35% CP caused an elevation in the epithelium thickness which can be correlated to an elevation in CP gel. This fact is related to occurrence of cell proliferation induction as reported in previous studies⁶ and this probability may be justified by and elevation in cell mitosis activity.^{6, 11}

5. Conclusion

The results of the present study indicate that CP can be toxic when tested at elevated concentrations. In fact, we could not find systemic toxicity after exposure to high concentration for 25 days. Although there are defensive mechanisms against irritation caused by bleaching agents the data obtained in this study reinforce the need for caution in the use of dental bleaching, because topically microscopic alterations were observed.

References

- [1] Stephan RM. The effect of urea in counteracting the influence of carbohydrates on the pH of dentin plaques. *Journal of Dental Research* 1943;22:63-71.
- [2] Stindt DJ, Quenette L. An overview of Gly-oxide liquid in control and prevention of dental disease. *Compendium of Continuing Education in Dentistry* 1989;10:514-520.
- [3] Haywood VB, Heymann HO. Nightguard vital bleaching: how safe is it? *Quintessence International* 1991;22:515-23.
- [4] Haywood VB, Heymann HO. Nightguard vital bleaching. *Quintessence International* 1989;20:173 – 176.
- [5] Halliwell B, Gutteridge MC. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochemistry Journal* 1984;219:1-14.
- [6] Gargiulo AW, Wentz FM, Orban B. Mitotic activity of human oral epithelium exposed to 30 percent hydrogen peroxide. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology* 1961; 14:474 – 92.
- [7] Cherry DV, Bowers DEJr, Thomas L, Redmond A. Acute toxicological effects of ingested tooth whiteners in female rats. *Journal of Dental Research* 1993;72:1298 – 1303.
- [8] Weitzman SA, Weitberg AB, Stossel TP, Schwartz j, Shklar, G. Effects of hydrogen peroxide on oral carcinogenesis in hamsters. *Journal of Periodontology* 1986;57:685 – 688.
- [9] Seale NS, McIntosh JE, Taylor AN. Pulpal reaction to bleaching of teeth in dogs. *Journal of Dental Research* 1981;60:948 – 53.
- [10] Bowles WH, Thompson, LR. Vital bleaching: the effects of heat and hydrogen peroxide on pulpal enzymes. *Journal of Endodontics* 1986;12:108 – 12.
- [11] Martin JH, Bishop JG, Guentherman RH, Dorman HL. Cellular response of gingival to prolonged application of dilute hydrogen peroxide. *Journal of Periodontology* 1968;39:208 – 210.
- [12] Dorman HL, Bishop, JD. Production of experimental edema in dog tongue with dilute hydrogen peroxide. *Oral Surgery* 1970;29:38 – 43.

- [13] Edwall L, Olgart L, Haegerstam G. Influence of vasodilator substances on pulpal blood flow in the cat. *Acta Odontologica Scandinavica* 1973;31:289 – 296.
- [14] Joiner A, Thakker G, Cooper Y. Evaluation of a 6% hydrogen peroxide tooth whitening gel on enamel and dentin microhardness in vitro. *Journal of Dentistry* 2004;32:27-34.
- [15] Efeoglu N, Wood D, Efeoglu C. Microcomputerised tomography evaluation of 10% carbamide peroxide applied to enamel. *Journal of Dentistry* 2005;33:561–567.
- [16] Novais RCP, Toledo OA. Estudo *in vitro* das alterações do esmalte dentário submetido à ação de um agente clareador. *Jornal Brasileiro de Clínica Odontológica Integrada* 2000;4:48 – 50.
- [17] McCracken MS, Haywood VB. Demineralization effect of 10 percent carbamide peroxide. *Journal of Dentistry* 1996;24(6):395-398.
- [18] Tam LE, Lim M, Khanna S. Effect of direct peroxide bleach application to bovine dentin on flexural strength and modulus in vitro. *Journal of Dentistry* 2005;33:451-458.
- [19] Robertello FJ, Dishman MV, Sarrett DC, Epperly AC. Effect of home bleaching products on mercury release from an admixed amalgam. *American Journal of Dentistry* 1999;12:227-30.
- [20] Hummert TW, Osborne JW, Norling BK, Cardens HL. Mercury in solution following exposure of various amalgams to carbamide peroxide. *American Journal of Dentistry* 1993;6:305-9.
- [21] Rotstein I, Dogan H, Avron Y, Shemesh H, Steinberg D. Mercury release from dental amalgam after treatment with 10% carbamide peroxide *in vitro*. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology* 2000;89:216-9.
- [22] Hegedüs C, Bistey T, Flora-Nagy E, Keszthelyi G, Jenei A. An atomic force microscopic study on the effect of bleaching agents on enamel surface. *Journal of Dentistry* 1999;27:509-515.
- [23] Sassa, S. ALA-D porphyria. *Seminars in Liver Disease* 1998;18:95-101.
- [24] Bechara EJD et al. A free radical hypothesis of lead poisoning and inborn porphyrias associated with 5-aminolevulinic acid overload. *Química Nova* 1993;16:385-392.

- [25] Sulieman M, Addy M, MacDonald E, Rees JS. The effect of hydrogen peroxide concentration on the outcome of tooth whitening: an in vitro study. *Journal of Dentistry* 2004;32:295-299.
- [26] Folmer V, Soares JCM, Rocha, JBT. Oxidative stress in mice is dependent on the free glucose content of the diet. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2002;34:1279-1285.
- [27] Gonçalves TL et al. Involvement of oxidative stress in the pre-malignant and malignant states of cervical cancer in women. *Clinical Biochemistry* 2005;38:1071-1075.
- [28] Sassa S. Delta-aminolevulinic acid dehydratase assay. *Enzyme* 1982;28:133-145.
- [29] Emanuelli T et al. Effect of mercuric chloride intoxication and dimercaprol treatment on δ -aminolevulinic acid dehydratase from brain, liver and kidney of adult mice. *Pharmacology & Toxicology* 1996;79:136-143.
- [30] Rocha JBT, Pereira ME, Emanuelli T, Christofari RS, Souza DO. Effect of treatment with mercury chloride and lead acetate during the second stage of rapid postnatal brain growth on delta-aminolevulinic acid dehydratase (ALA-D) activity in brain, liver kidney and blood of suckling rats. *Toxicology* 1995;100:27-37.
- [31] Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Annals of Biochemistry* 1979;95:351-358.
- [32] Enerbäck L. Mast cells in rat gastrointestinal mucosa. 2. Dye-binding and metachromatic properties. *Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavia* 1966;66:303-312.
- [33] Osol A, Pratt R, Altschule MD. The United States dispensatory and physician's pharmacology. 26th ed. *Hydrogen peroxide solution*. Philadelphia: Lippincott Co, 1967:583.
- [34] Flaitz CM, Hicks MJ. Effects of carbamide peroxide whitening agents on enamel surfaces and caries-like lesion formation: An SEM and polarized light microscopic in vitro study. *Journal of Dentistry for Children* 1996;63:249-256.
- [35] Hosoya N, Honda K, Lino F, Arai T. Changes in enamel surface roughness and adhesion of *Streptococcus mutans* to enamel after vital bleaching. *Journal of Dentistry* 2003;31:543-548.

- [36] McCracken MS, Haywood VB. Effects of 10% carbamide peroxide on subsurface hardness on enamel. *Quintessence International* 1995;26:21-4.
- [37] Wandera A, Feigal RJ, Douglas WH, Pintado MR. Home-use tooth bleaching agents: an *in vitro* study on quantitative effects on enamel, dentin and cementum. *Quintessence International* 1994;25:541-6.
- [38] Sulieman M, Addy M, Macdonald E, Rees JS. The bleaching depth of 35% hydrogen peroxide based in-office product: a study in vitro. *Journal of Dentistry* 2005;33:33-40.
- [39] Seale NS, Wilson CFG. Pulpal response to bleaching of teeth in dogs. *Pediatric Dentistry* 1985;7:209-14.
- [40] Bowles WH, Burns JRH. Catalase/peroxidase activity in dental pulp. *Journal of Endodontics* 1992;18:527-9.
- [41] Esposito P, Varvara G, Murmura G, Terlizzi A, Caputi S. Ability of healthy and inflamed human dental pulp to reduce hydrogen peroxide. *European Journal of Oral Science* 2003;111:454-456.
- [42] Bayton KJ, Bewtra JK, Biswars N, Taylor KE. Inactivation of horseradish peroxidase by phenol and hydrogen peroxide: a kinetic investigation. *Biochimica et Biophysica Acta* 1994;1206:272-8.
- [43] Tipton DA, Braxton SD, Dabbous MK. Role of saliva and salivary components as modulators of bleaching agents toxicity to human fibroblasts in vitro. *Journal of Periodontology* 1995;66:766-74.
- [44] Boveris A, Oshino, N, Chance, B. The cellular production of hydrogen peroxide. *Biochemistry Journal* 1972;128:617-630.
- [45] Anderson DG, Chiego DJJr, Glickman GN, McCaluley LK. A clinical assessment of the effects of 10% carbamide peroxide gel on human pulp tissue. *Journal of Endodontics* 1999;25:247-50.
- [46] Nogueira CW, Santos FW, Soares FA, Rocha JBT. 2,3-Dimercaptopropanol, 2,3-dimercaptopropane-1-sulfonic acid, and meso-2,3-dimercaptosuccinic acid inhibit δ -aminolevulinate dehydratase from human erythrocytes *in vitro*. *Environmental Research* 2004;94:254-261.

- [47] Ryan CS, Kleinberg I. Bacteria in human mouths involved in the production and utilization of hydrogen peroxide. *Archives of Oral Biology* 1995;8:753-63.
- [48] Ruh J et al. Effects of hydrogen peroxide scavenger catalase on villous microcirculation in the rat small intestine in a model of inflammatory bowel disease. *Microvascular Research* 2000;59:329-337.
- [49] Humberston CL, Dean BS, Krenzelok, EP. Ingestion of 35% hydrogen peroxide. *Journal of Toxicology Clinical Toxicology* 1990;28:95-100.
- [50] Drewa JE, Arthur JR, Farguharson AJ, Russel R, Morrice PC, Duthie GG. Salicylic acid modulates oxidative stress and glutathione peroxidase activity in the rat colon. *Biochemical Pharmacology* 2005;70:888–893.
- [51] Chu F-F, Esworthy RS, Doroshov JH. Role of Se-dependent glutathione peroxides in gastrointestinal inflammation and cancer. *Free Radical in Biology and Medicine* 2004;36:1481-1495.
- [52] Watanabe T et al. Dysfunction of antioxidative enzymes in the trinitrobenzenesulfonic acid-induced colitis rat. *Pathophysiology* 1998;5:191–198.
- [53] Rees TD, Orth CF. Oral ulcerations with use of hydrogen peroxide. *Journal of Periodontology* 1986;57:689 – 92.
- [54] Jonas S, Riley P, Wilson R. Hydrogen peroxide cytotoxicity. Low-temperature enhancement by ascorbate or reduced lipoate. *Biochemistry Journal* 1989;264:651-655.
- [55] Powell V, Bales D. Tooth bleaching: it's effect on oral tissues. *Journal of American Dental Association* 1991;122:50-4.
- [56] Tipton DA, Braxton SD, Dabbous MK. Effects of a bleaching agent on human gingival fibroblasts. *Journal of Periodontology* 1995;66:7-13.
- [57] Oda D, Nguyen MP, Royack GA, Tong DC. H₂O₂ oxidative damage in cultured oral epithelial cells: the effect of short-term vitamin C exposure. *Anticancer Research* 2001;21(4A):19-24.
- [58] Orban B. Action of oxygen on chemically inflamed tissue. *Journal of American Dental Association* 1942;29:2018-2025.
- [59] Rotstein R. *In vitro* determination and quantification of 30% hydrogen peroxide penetration through dentin and cementum during bleaching. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology* 1991;72:602-606.

[60] Barnard GF, Stoh R, Hohberger LH, Shemin D. Mechanism of porphobilinogen synthase. Possible role of essential thiol groups. *Journal of Biology Chemistry* 1977;252:8965-8974.

Figures

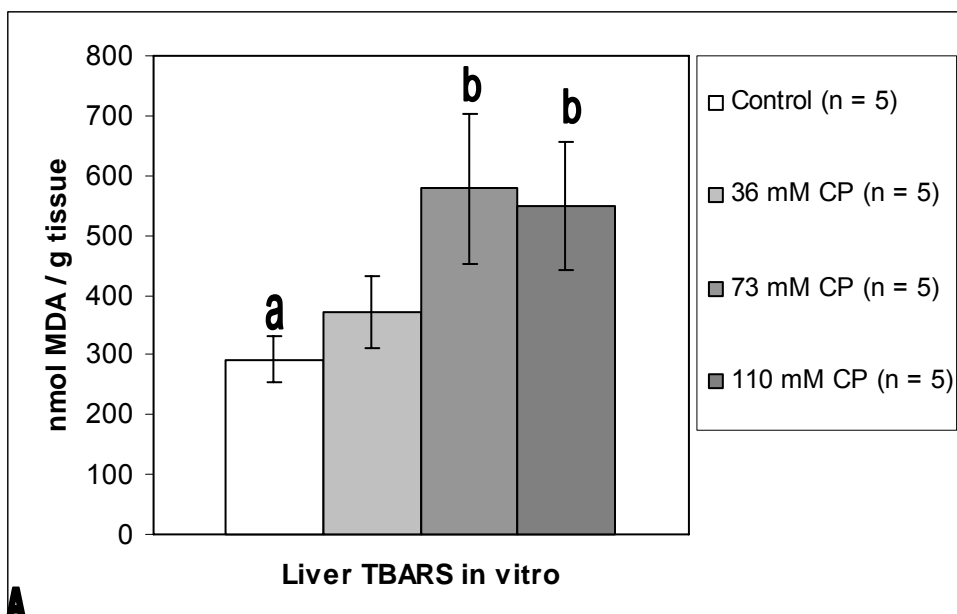


Fig.1-A. Hepatic TBARS levels after incubation with CP and carbopol gel (control group) *in vitro*.

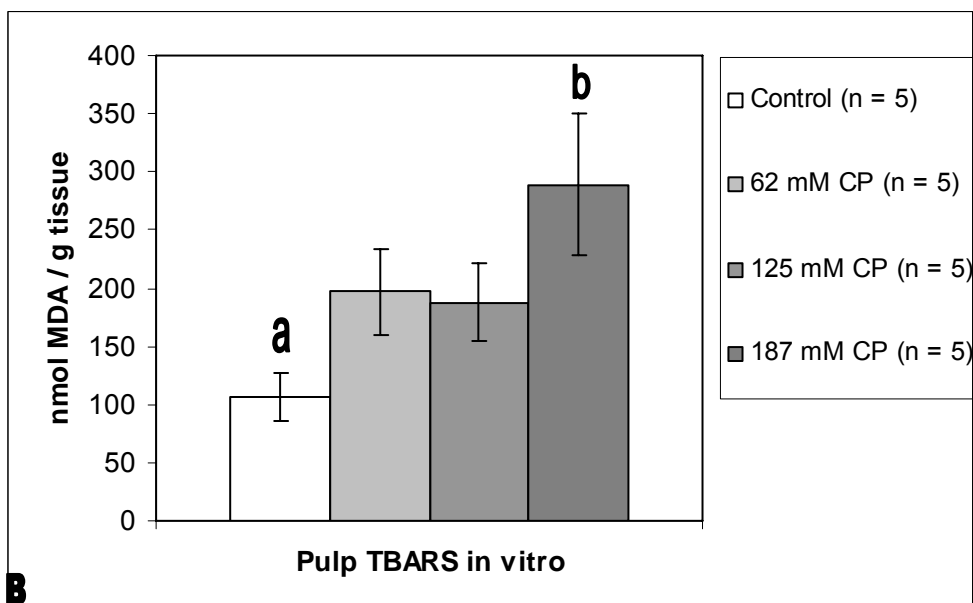


Fig. 1-B. Pulp TBARS levels after incubation with CP and carbopol gel (control group) *in vitro*.

a, b Different letters indicate significant difference from control.

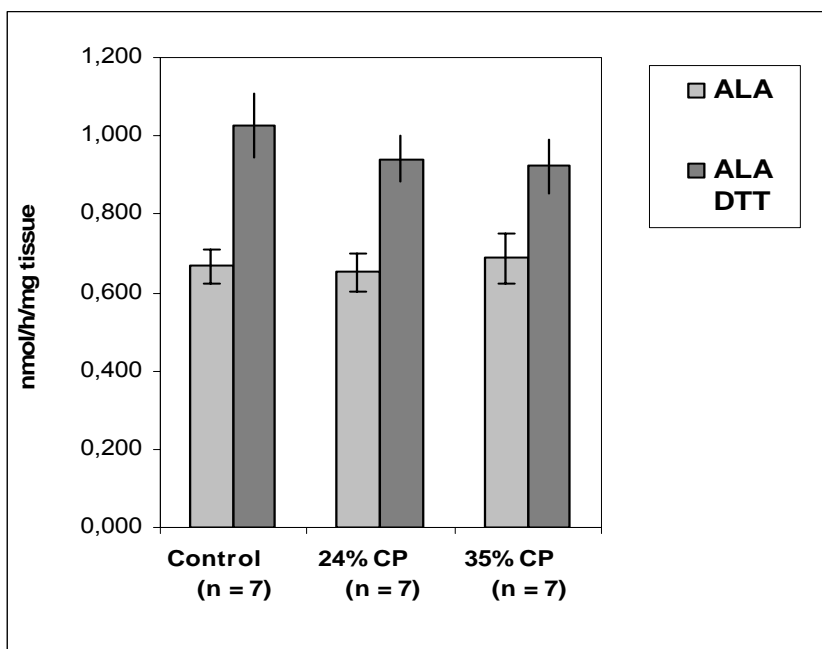


Fig. 2. δ -ALA-D activity in liver from control (1% carbopol gel), 24% and 35% CP treated animals.

ALA DTT: δ -ALA-D activity activation by dithiothreitol.

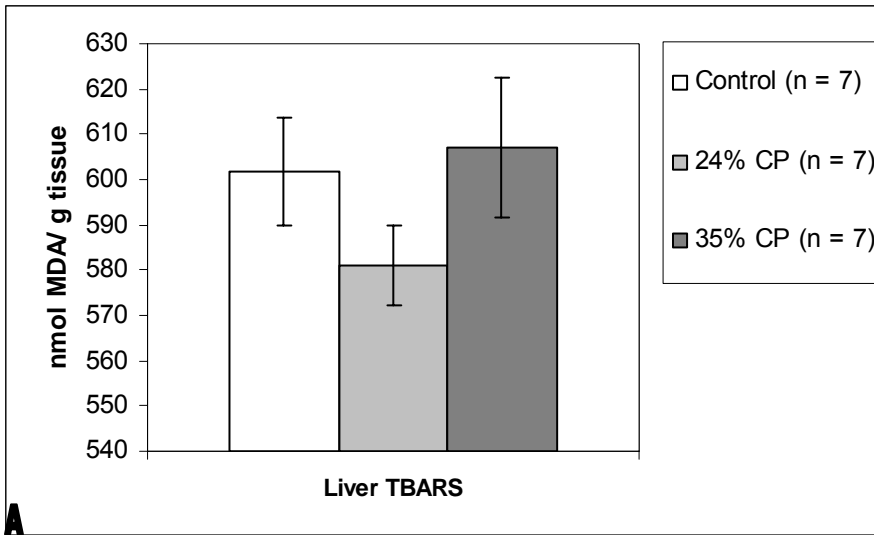


Fig. 3-A. Hepatic TBARS levels from animals submitted to the treatment of 24%, 35% CP and 1% carbopol gel (control group).

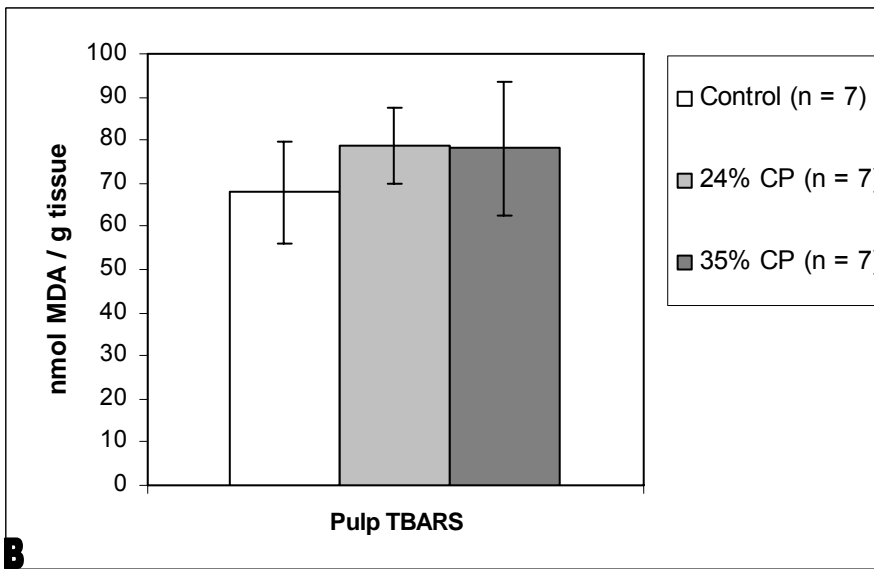


Fig 3-B. TBARS levels of pulp tissue from animals submitted to the treatment of 24%, 35% CP and 1% carbopol gel (control group).

Tables

Table 1 – Palatal epithelium tissue quantifications from animals submitted to the treatment with CP and 1% carbopol gel for 25 days (Values are expressed as means followed by standard error variation).

* significantly different from control

	Control (1% carbopol; n = 4)	24% CP (n = 4)	35% CP (n = 4)	35% CP – 15 days after treatment (n = 4)
Epitelium thickness (µm)	83.74 (12.51)	94.48 (16.53)	81.17 (7.23)	146.38 (6.82)*
Keratin thickness (µm)	15.44 (3.55)	20.44 (4.05)	43.51 (18,67)	35.89 (6.84)
Number of cell layers	12.13 (1.44)	14.28 (1.81)	12.36 (0.97)	20.73 (0.88)*
Number of mast cells per field	1.91 (0.15)	3.16 (0.44)	3,99 (1.06)*	3.24 (0.15)
Basal cell layer thickness (µm)	8.54 (0.18)	9.29 (0.17)	15.41 (1.09)*	8.91 (0.16)

Carbamide peroxide and dental amalgam metals effect in TBARS production in liver, brain, kidney and pulp of rats *in vitro*

Fernanda Neisse, Maele M. M. Patuzzi, João B. T. Rocha

Departamento de Química, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil

Short title: **Effect of carbamide peroxide and amalgam metals in rat tissues *in vitro***

Corresponding author:

Fernanda Neisse

Departamento de Química, Centro de Ciências Naturais e Exatas

Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

Campus UFSM s/n – Camobi

97105-900

Fone: +5532208041

Fax: +5532208031

e-mail: feneisse@yahoo.com.br

Abstract

Dental bleaching, an aesthetic modern procedure, is usually carried out with products containing carbamide peroxide (CP) as active ingredient which when in contact, affect metal content from amalgam restorations. The aim of the present study was to investigate the possible toxic effects of dental amalgam metals and CP *in vitro*. The parameter studied for characterization of CP and metal constituents of dental amalgam – mercury [Hg(II)], copper [Cu(II)], zinc [Zn(II)], tin [Sn(II)] and silver [Ag(I)] - toxicity *in vitro* was 2-thiobarbituric acid–reactive substance (TBARS) levels in rat liver, brain, kidney, and dental pulp. CuSO₄ and SnCl₂ produced a significant decrease in liver TBARS levels when tested at concentrations of 100 and 200 µM. In brain, 100 µM CuSO₄ caused an increase in TBARS production. In dental pulp, 100 and 200 µM HgCl₂ caused an increase in TBARS production. Carbopol gel caused a decrease in TBARS production in all tissues. CP induced an increase in TBARS levels in brain, but did not change TBARS levels in liver and kidney. When amalgam metals constituents and CP dissolved in carbopol were incubated together, carbopol and 200 µM SnCl₂ significantly decreased brain TBARS production. CP was found to have some pro-oxidant activity, because provoked an elevation in TBARS production when compared to the homogenate control levels.

Keywords: carbamide peroxide, carbopol, TBARS, dental amalgam.

Abbreviations: Ag, Silver; CP, Carbamide Peroxide; Cu, Copper; Fe, Iron; Hg, Mercury; Hg⁰, Elemental mercury vapor; H₂O₂, Hydrogen Peroxide; Pd, Palladium; ROS, Reactive Oxygen Species; Sn, Tin; TBARS, 2-thiobarbituric acid-reactive substances; Zn, zinc.

1. Introduction

Tooth bleaching is a dental technique which has been currently used by dentists for correcting certain tooth discolorations, and a variety of commercial preparations containing carbamide peroxide (CP) in concentrations ranging from 3-50% are available (Haywood and Heymann, 1991). CP is a substance which decomposes into hydrogen peroxide (H_2O_2), its main active ingredient, urea, ammonia and carbon dioxide (Adept, 1991).

The potential deleterious effect of CP may be mediated by H_2O_2 formation, a toxic specimen that can diffuse and react with vulnerable parts of the cells. It contributes to bleaching process via formation of strongly reactive intermediary ions and oxygen, particularly in the presence of ferric and ferrous ions (Halliwell and Gutteridge, 1984). Clinically, H_2O_2 is known to induce the formation of neoplastic lesions (Weitzman et al., 1986) and short-term H_2O_2 application can increase mitotic activity and hyperplasia (Gargiulo et al., 1961). H_2O_2 can also injure dental pulp (Seale et al., 1981) and its enzymes (Bowles and Thompson, 1986). Additionally, H_2O_2 can cause gingival inflammation (Martin et al., 1968), severe edema of the tongue and frenulum (Dorman and Bishop, 1970) and depress the microcirculation (Edwall et al., 1973). Studies on systemically toxicity proved that the ingestion of large doses of commercial preparations of teeth whiteners may be acutely toxic and even fatal to female laboratory rats (Cherry et al., 1993).

Other studies demonstrated that CP, the main component of commercially prepared gels, can cause tooth morphologic structural alterations *in vitro* (Novais and Toledo, 2000), may penetrate through the tooth (Seale et al., 1981; Goldstein et al., 1989), and consequently alter enamel Ca/P ratio (Rotstein et al., 1996). In line with this, bleaching can diminish enamel hardness (Akal et al., 2001).

During nightguard bleaching treatment, some tooth whitener is released from the stent and may be swallowed, absorbed or expectorated (Haywood and Heymann, 1989) and even when the product is applied on anterior teeth, excessive gel may inadvertently come into contact with amalgam of posterior teeth restorations (Rotstein et al., 2000).

Dental amalgams are inexpensive restorations that have been in use for over 150 years, and are thought to be more durable and easier to use than other types of fillings. Amalgams consists mainly of 45-50 % mercury (Hg), 25-30 % silver (Ag), 15-30 % tin (Sn), 2-30 % copper (Cu), but sometimes other metals such as zinc (Zn) and palladium (Pd) are added (Phillips, 1986). Consequently, amalgams are potential sources of Hg and a hazard for human health (Siblerud, 1990; Siblerud and Kienholz, 1994; Clarkson et al., 2003). *In vivo* studies have shown that brain, blood and urinary mercury concentrations correlate with the number of amalgam surfaces present (Fredin, 1987; Kingman et al., 1998). After amalgam removal, temporary elevations in blood concentrations were also observed (Molin et al., 1990).

Clinically, during corrosion, dental restorations release metals for short-term (days) and long-term (months) periods which are delivered to the oral environment (Brune, 1986; Wataha et al., 1991). In addition, external factors can influence Hg release from amalgam restorations like bruxism (Isacsson et al., 1997), occlusal contacts, temperature variation (Björkman and Lin, 1992), teeth brushing (Wahl, 2001), laser treatment (Pioch and Mathias, 1998) and chewing gum (Sallsten et al., 1996). Of particular importance, CP and H₂O₂ can increase Hg and Ag levels on amalgam surfaces (Rotstein et al., 1997) and also their release to the phosphate buffer solution (Hummert et al., 1993; Rotstein et al., 2000; Steinberg et al., 2003).

Nowadays, literature data proposes an increase in whitening agents concentration, so the treatment period can be reduced (Sulieman et al., 2004), but it still usually requires multiple applications, what can represent a continuous source of oxidative damage to organism tissues. Nevertheless, little is known about the systemic toxic effects of these compounds, or their synergistic effect when in contact with amalgam metal ions. Since the use of these over-the-counter products are increasing over time, due to the availability to the consumer for use without the supervision of a dental professional, and that they can be occasionally swallowed by the patient or may remain in contact with restorations and tissue for hours, it becomes important to investigate their toxicity them in animal models. In our study we used the 2-thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS) quantifications from pulp, liver, brain and kidney as end points of toxicity.

2. Materials and Methods

2.1 Chemicals

The CP prepared gels employed contained CP and carbopol 1% (vehicle). CP was obtained from a heated mixture of H₂O₂ (40%) and triturated urea (60%) under a 100°C water bath until CP crystals were obtained. After that, CP was mixed with 1% carbopol gel. H₂O₂ was obtained from Alfa Química (Brazil), urea and 1% carbopol gel from Galena (São Paulo, Brazil). 2-Thiobarbituric acid was obtained from Sigma (St. Louis, MO, USA). Phosphoric acid was obtained from Nuclear. Acetic acid was obtained from Merck (Darmstadt, Germany). Trichloroacetic acid was obtained from Nuclear (Brazil). HgCl₂, CuSO₄, ZnCl₂, SnCl₂ and AgNO₃ were obtained from Sigma (St. Louis, MO, USA) and Merck (Darmstadt, Germany) and were dissolved in deionized water. Liver bovine catalase was obtained from Sigma (St. Louis, MO, USA).

2.3 Tissue preparation

Animals were anesthetized with ether and killed by decapitation. The pulps of incisors were used. Liver, brain and kidney were quickly removed and placed on ice. Tissues were homogenized in 10 volumes and of 150 mM saline, containing 10 mM Tris-HCl (pH 7.0) with 10 up-and-down strokes at approximately 1200 rev/min in a Teflon-glass homogenizer. The homogenate was centrifuged at 800 X g using a refrigerated centrifuge for 10 minutes to give a supernatant fraction that was used in the enzyme and 2-thiobarbituric acid–reactive substance assays (TBARS). Metals dissolved in deionized water and CP gel were incubated alone or together with tissues homogenates.

2.4 TBARS reaction

Lipid peroxidation products were evaluated as TBARS, and levels were determined according to Ohkawa et al., 1979. Briefly, the reaction mixture contained 200 µl 8.1% SDS, 200 µl low-speed supernatant fraction (S₁), 500 µl 1.267 mol/l acetic acid, 270 mmol/l HCl, pH 3.5, and 500 0.8% TBA. TBARS were quantified by adding S₁ directly to the above reaction medium. Samples were incubated at 37°C for 120

minutes, then 10 μ l of catalase was added and after 20 min tubes were put in a water bath at 100 °C for 60 min. Then they were centrifuged at 1000 \times *g* for 15 min at 4 °C. The amount of TBARS produced was measured at 532 nm, using MDA to construct standard curves.

2.5 Statistical analysis

The results are expressed as mean followed by standard error (S.E.). Data were analyzed by one-way ANOVA, followed by Duncan test. Differences between groups were considered to be significant when $p \leq 0.05$.

3. Results

3.1 Effect of HgCl₂, CuSO₄, ZnCl₂, SnCl₂ and AgNO₃ in hepatic, cerebral, renal, and dental pulp TBARS levels

CuSO₄ and SnCl₂ caused a significant decrease in hepatic TBARS when tested at 100 and 200 µM compared to control ($p < 0,05$; Figure 1). HgCl₂ and ZnCl₂ provoked an increase in hepatic TBARS but it was not statistically different from control. In brain, CuSO₄ (100 µM) caused a significant increase in TBARS production ($p < 0,05$; Figure 2). In dental pulps, HgCl₂ caused a significant increase in TBARS production ($p < 0,05$; Figure 4).

3.2 Effect of carbopol gel and CP in liver, brain and kidney TBARS

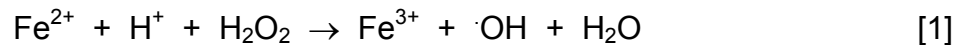
Statistical analysis indicated that carbopol gel caused a significant decrease in TBARS production of about 65 (liver), 30 (brain), and 40 (kidney) % when compared to control ($p < 0,05$; $N = 4$; Figure 5). In brain, CP caused a small but significant increase in TBARS production that varied from 15-30 % ($p < 0,05$; Figure 6A-B). In liver and kidney, CP did not stimulate TBARS production ($p > 0,05$; Figure 6A-C).

3.3 Effect of combined incubation with carbopol, CP and metal ions in hepatic, cerebral and renal TBARS levels

Hepatic TBARS levels were increased by Zn²⁺ and simultaneous incubation with CP did not change the Zn effect on TBARS production ($p > 0,05$; Figure 7A). In brain, SnCl₂ caused a significant decrease in TBARS production and this effect was abolished by simultaneous incubation with CP. Simultaneous incubation of kidney homogenates to metals and CP did not cause any significant effect ($p > 0,05$; Figure 7C).

4. Discussion

Bleaching treatment is guided by an oxidation reaction which depends on the active agent concentration. This process commonly uses H₂O₂, either directly or via its generation by CP degradation (Haywood and Heymann, 1989) that enhances ROS production in oral environment. H₂O₂ can be potentially toxic to the cells via its breakdown to the highly reactive hydroxyl radical, which is short-lived reactive (Ward, 1975; DeSesso, 1979), but can potentially react with cellular nucleophiles such as DNA, causing DNA strand toxicity and rapid cell death (DeSesso, 1979; Fantel, 1996; Wells et al., 1997). As shown in the well-characterized Fenton reaction (Equation 1), this reduction requires the presence of unchelated ferrous iron:



In a recent *in vitro* study from our laboratory, we showed that CP increased dental pulp TBARS production only when tested at high concentrations (187 mM) (Neisse et al. submitted). As there is no prediction of pulp chamber CP concentration after bleaching procedure, the mechanism by which the pulp may protect itself from HP is through enzymatic breakdown of the molecule by pulp peroxidase and catalase (Bowles and Burns, 1992; Esposito et al., 2003).

Dental set amalgam is a dynamic material, which undergoes many changes related to the nature of the amalgam matrix and corrosive environment of the mouth (Hanson and Pleva, 1991).

Hg, the major component of dental amalgam, is thought to generate reactive oxygen species *in vivo* and *in vitro* (Stohs and Bagchi, 1995). Investigation about metallic ions penetration from restorations into teeth have showed that marked Hg, Cu and Zn effused from amalgam restorations into enamel and dentin *in vitro* (Söremark et al., 1968). Additionally, from amalgam components, mercury can have its release amplified by exposure to agents as CP, which in turns becomes available to the surrounding tissues (Rotstein et al., 2000) and can penetrate into pulp (Akyüs and Çağlar, 2002). In the present study, we observed that only HgCl₂ stimulated dental pulp TBARS production. A number of studies demonstrate the ability of Hg to interact with soluble and protein bound –SH groups, and may exert toxic effect on transport system

(Moschèn et al., 2001). This interaction can produce reactive oxygen species (ROS) such as superoxide anion, H_2O_2 , hydroxyl-radical which can induce oxidative injury to tissues via diverse mechanisms (e.g. lipid peroxidation, DNA damage, alterations of calcium homeostasis) (Stohs and Bagchi, 1995). Another previous research has shown that inorganic mercury in neuronal cell bodies result in axonal shrinkage (Pamphlett and Png, 1998). The results of these studies have interesting implications for the practice of dentistry since it is likely that both the A-delta and unmyelinated c-fibers found in pulp tissue are susceptible to toxic damage from Hg (Hahn et al., 1990).

Amalgam restorations are important source of Hg in saliva, which possesses antioxidant activity exerted by different compounds as antioxidant enzymes and reducing compounds (Moore et al., 1994). Anyway, a study *in vivo* confirmed that the release of Hg from dental amalgam in female rats decreased the salivary total antioxidant activity, which may be associated with a lessened resistance to further oxidative injury (Pizzichini et al., 2002). Absorption of amalgam Hg by the oral mucosa, respiratory and gastrointestinal tract may be toxic to body tissues (Berglund, 1995). It can cause a variety of systemic adverse effects when elemental mercury vapor (Hg^0) is released from dental amalgam and is inhaled (Vimy and Lorschneider, 1990), absorbed by lung, gastrointestinal and oral tissues (Hahn et al., 1989), and retained mainly in the kidney and liver (Hahn et al., 1989; 1990) and central nervous system (Nylander et al., 1987; Weiner and Nylander, 1993), by retrograde axon transport in primary sensory neurons (Arvidson and Arvidsson, 1990).

Hg from amalgam may cause neurological disorders (Clarkson, 1989), and has previously been shown to be a potent inhibitor of enzymes, especially those containing sulfhydryl groups (Edstrom and Mattson, 1976). Otherwise, in an *in vitro* study investigating the neurotoxicity of dental amalgam, it was demonstrated that amalgam toxicity was not mediated by release of Hg, since 200 μM Sn caused 15% cell death. Zn was the primary toxic substance released and there was enough Zn in the amalgam to be responsible for the toxicity to nerve cells in culture (Lobner and Asrari, 2003). It has been considered that different elements have different labilities and Zn is considered to be relatively labile compared with other dental amalgam metals, which is not proportional to its mass composition (Wataha and Lockwood, 1998). Only $CuSO_4$

caused a significant increase in brain TBARS production, which returned to control values when brain homogenates were incubated with CP and carbopol. When brain homogenates were incubated with carbopol and SnCl₂ there was a significant decrease in TBARS production.

Hg causes oxidative damage to the kidney, inhibiting the antioxidant role of GSH and forming a reactive Hg-thiol complex, which can interact with H₂O₂ to promote the oxidation of bio-molecules (Miller and Woods, 1993). The most common effect of inorganic Hg is nephrotoxicity (Klassen, 1990). In our study, we did not observe an elevation in kidney TBARS production when tissue homogenates were incubated with metals alone or with CP.

In our study CuSO₄ and SnCl₂ caused a decrease in liver TBARS. Our data indicated that this effect was not observed when liver homogenates were incubated with CP in the presence of amalgam metals. A previous *in vitro* study also investigated the effect of HgCl₂ on hepatic and renal TBARS production, but only when homogenates were incubated with extremely high concentrations (400 μM) a significant elevation in TBARS production was observed (Perottoni et al, 2004). When CuSO₄ was incubated with brain homogenates, there was a different response of increase formation of TBARS products. Previous studies indicate that generally, toxicities produced by the transition metals involve hepatotoxicity, neurotoxicity, and nephrotoxicity. Specific differences in the toxicities of metal ions may be related to differences in solubilities, absorbability, transport, chemical reactivity, and the complexes that are formed within the organism. These specific differences are also related to the target organ, as nature of cell membranous composition, or specific cell membranous fraction (Stohs and Bagchi, 1995). In line with this, there is ample evidence that metal ions are required for hydroxyl radical formation, but these ions may be bound at specific sites that are not readily accessible to some scavengers and chelators (Halliwell and Gutteridge, 1990).

When ions are incubated with a biological system, very often the sensitization effect of these ions occurs inside the biological entity. In order for this effect to be expressed, it is essential to transport the metal ion or its complex into the cell. Ligands of these metal ions may impede or facilitate the transport of these ions or their compounds

through the cell membrane (Sturm et al., 2006). Therefore these chelates may enhance or not the effect of amalgam metal ions.

In our study, the effects exerted by metal ions when incubated solely with tissue homogenates were reduced when carbopol gel was incubated together. Carbopols, which are very high molecular weight polymers of acrylic acid, have been shown to be highly sensitive to ions (Kelly et al., 2004). Adhesion capacity of this substance to mucosa is due to the ability of functional groups (COOH) to form hydrogen bridges to interpenetrate the mucus layer (Tang et al., 2005). The pH value of the dissolution medium determines the percentage of ionised carbopol acidic groups at the external layers of the gel matrix (Bonacucina et al., 2004). Carbopol acidic nature when gel is dissociated may exert a chelating function and explain the reduced effect of metal ions when incubated together in this *in vitro* study.

5. Conclusion

Results from our study indicate that CP can be toxic since it provoked a significant increase of TBARS when incubated with brain homogenates.

From metals investigated, CuSO_4 caused an increase in brain TBARS levels and HgCl_2 provoked an elevation in pulp TBARS what has important implication for dental practice.

Consequently, additional care is needed when bleaching treatment is performed in amalgam restored teeth because this treatment can be a pulp toxicity inducer since there is a possibility of Hg pulp concentrations rising which was demonstrated to be a pro-oxidant situation.

REFERENCES

- Adept. Lightening Natural Teeth. ADEPT Report 1991; 2 (1): 1-24.
- Akal N, Over H, Olmez A, Bodur H. Effects of carbamide peroxide containing bleaching agents on the morphology and subsurface hardness enamel. *J Clin Pediatr Dent* 2001; 25: 293-296.
- Akyüs S, Çağlar E. Pulpal uptake of mercury from lined amalgam restoration in guinea pigs. *Eur J Oral Sci* 2002; 110 : 460-463.
- Arvidson B, Arvidsson J. Retrograde axonal transport of mercury in primary sensory neurons innervating the pulp in the rat. *Neurosci Lett* 1990; 115 (1): 29-32.
- Berglund F. 150 years of dental amalgam. Case reports spanning 150 years on the adverse effects of dental amalgam. Relationship to poisoning by elemental mercury. Orlando (FL):Bio-Probe, Inc, 1995, pp. 6-26.
- Björkman L, Lin B. Factors influencing mercury evaporation rate from dental amalgam fillings. *Scand J Dent Res* 1992; 100: 354-360.
- Bonacucina G, Martelli S, Palmieri GF. Rheological, mucoadhesive and release properties of Carbopol gels in hydrophilic cosolvents. *Int J Pharm* 2004; 282 (1-2): 115-130.
- Bowles WH, Thompson, LR. Vital bleaching: the effects of heat and hydrogen peroxide on pulpal enzymes. *J Endod* 1986; 12: 108 – 12.
- Bowles WH, Burns JRH. Catalase/peroxidase activity in dental pulp. *J Endod* 1992; 18: 527-9.
- Brune D. Metal release from dental biomaterials. *Biomaterials* 1986; 7: 163-175.
- Cherry DV, Bowers DE Jr, Thomas L, Redmond A. Acute toxicological effects of ingested tooth whiteners in female rats. *J Dent Res* 1993; 72: 1298 – 1303.
- Clarkson TW. Mercury. *J Am Col Toxicol* 1989; 8: 1291-1296.
- Clarkson TW, Magos L, Myers GJ. Current concepts: The toxicology of mercury – current exposures and clinical manifestations. Review. *New Engl J Med* 2003; 349 (18): 1731-1737.
- DeSesso JM. Cell death and free radicals: A mechanism for hydroxyurea teratogenesis. *Med Hypoth* 1979; 5: 937-951.

- Dorman HL, Bishop JG. Production of experimental edema in dog tongue with dilute hydrogen peroxide. *Oral Surg* 1970; 29: 38 – 43.
- Edstrom A, Mattsson H. Inhibition and stimulation of rapid axonal transport in vitro by sulfhydryl blockers. *Brain Res* 1976; 108: 381-395.
- Edwall L, Olgart L, Haegerstam G. Influence of vasodilator substances on pulpal blood flow in the cat. *Acta Odontol Scand* 1973; 31: 289 – 296.
- Esposito P, Varvara G, Murmura G, Terlizzi A, Caputi S. Ability of healthy and inflamed human dental pulp to reduce hydrogen peroxide. *Eur J Oral Sci* 2003; 111: 454-456.
- Fantel AG. Reactive oxygen species in developmental toxicity: Review and hypothesis. *Teratol* 1996; 53: 196-217.
- Fredin B. The distribution of mercury in various tissues of guinea-pigs after application of dental amalgam fillings (a pilot study). *Sci Tot Environ* 1987; 66: 263-268.
- Gargiulo AW, Wentz FM, Orban B. Mitotic activity of human oral epithelium exposed to 30 percent hydrogen peroxide. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1961; 14: 474 – 92.
- Goldstein CE, Goldstein RE, Feinman RA. Bleaching vital teeth: state of the art. *Quintessence Int* 1989; 20: 729 – 737.
- Hahn LJ, Kloiber R, Vimy MJ, Takahashi Y, Lorscheider FL. Dental silver tooth fillings: a source of mercury exposure revealed by whole-body image scan and tissue analysis. *FASEB J* 1989; 3: 2641-2646.
- Hahn LJ, Kloiber R, Leininger RW, Vimy MJ, Lorscheider FL. Whole-body imaging of the distribution of mercury released from dental fillings into monkey tissues. *FASEB J* 1990; 4: 3256-3260.
- Halliwell B, Gutteridge MC. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem J* 1984; 219: 1-14.
- Halliwell B, Gutteridge JMC. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: An overview. *Meth Enzymol* 1990; 186: 1-85.
- Hanson M, Pleva J. The dental amalgam issue. A review. *Experientia* 1991; 47: 9-22.
- Haywood VB, Heymann HO. Nightguard vital bleaching. *Quintessence Int* 1989; 20: 173 – 176.
- Haywood VB, Heymann HO. Nightguard vital bleaching: how safe is it? *Quintessence Int* 1991; 22: 515-23.

- Hummert TW, Osborne JW, Norling BK, Cadenas HL. Mercury in solution following exposure of various amalgams to carbamide peroxide. *Am J Dent* 1993; 6: 305-309.
- Isacsson G, Barregard L, Seldén A, Bodin L. Impact of nocturnal bruxim on mercury uptake from dental amalgam. *Eur J Oral Sci* 1997; 105: 251-257.
- Kelly HM, Deasy PB, Busquet M, Torrance AA. Bioadhesive, rheological, lubricant and other aspects of an oral gel formulation intended for the treatment of xerostomia. *Int J Pharm* 2004; 278 (2): 391-406.
- Kingman A, Albertini T, Brown LJ. Mercury concentrations in urine and whole blood associated with amalgam exposure in a US military population. *J Dent Res* 1998; 77: 461-471.
- Klaassen, CD. Heavy metals and heavy metal antagonists. In: A. G. Gilman, T. W. Rall, A. S. Sies, P. Taylor, editors. *The Pharmacological basis of therapeutics*. Pergamon Press, New York, 1990, pp. 1592-1598.
- Lobner D, Asrari M. Neurotoxicity of dental amalgam is mediated by zinc. *J Dent Res* 2003; 82 (3): 243-246.
- Martin JH, Bishop JG, Guentherman RH, Dorman HL. Cellular response of gingival to prolonged application of dilute hydrogen peroxide. *J Periodontol* 1968; 39: 208 – 210.
- Miller DM, Woods JS. Redox activities of mercury-thiol complexes: implications for mercury-induced porphyria and toxicity. *Chem Biol Interact* 1993; 88: 23-35.
- Molin M, Bergman B, Marklund SL, Schutz A, Skerfving S. Mercury, selenium, and glutathione peroxidase before and after amalgam removal in man. *Acta Odontol Scand* 1990; 48: 189-202.
- Moore S, Calder KAC, Miller NJ, Rice-Evans CA. Antioxidant activity of saliva and periodontal disease. *Free Radic Res* 1994; 21: 417-425.
- Moschèn I, Schweizer K, Wagner CA, Geis-Gerstorfer J, Lang F. Effects of gallium and mercury ions on transport systems. *J Dent Res* 2001; 80 (8): 1753-1757.
- Novais RCP, Toledo OA. Estudo *in vitro* das alterações do esmalte dentário submetido à ação de um agente clareador. *JBC* 2000; 4: 48 – 50.
- Nylander M, Friberg L, Lind B. Mercury concentration in the human brain and kidneys in relation to exposure from dental amalgam fillings. *Swed Dent J* 1987; 11: 179-187.

- Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979; 95: 351–358.
- Pamphlett R, Png FY. Shrinkage of motor axons following systemic exposure to inorganic mercury. *J Neuropathol Exp Neurol* 1998; 57: 360-366.
- Perottoni J, Lobato LP, Silveira A, Rocha JBT, Emanuelli T. Effects of mercury and selenite on δ -aminolevulinatase activity and on selected oxidative stress parameters in rats. *Environ Res* 2004; 95: 166-173.
- Pioch T, Mathias J. Mercury vapor release from dental amalgam after laser treatment. *Eur J Oral Sci* 1998; 106: 600-602.
- Pizzichini M, Fonzi M, Sugherini L, Fonzi L, Gasparoni A, Comporti M, Pompella A. Release of mercury from dental amalgam and its influence on salivary antioxidant activity. *Sci Total Environ* 2002; 284: 19-25.
- Rotstein I, Danker E, Goldman A, Heling I, Stabholz A, Zalkind M. Histochemical analysis of dental hard tissues following bleaching. *J Endod* 1996; 22: 23 – 6.
- Rotstein I, Mor C, Arwaz JR. Changes in surface levels of mercury, silver, tin and copper of dental amalgam treated with carbamide peroxide and hydrogen peroxide. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1997; 83: 506-509.
- Rotstein I, Dogan H, Avron Y, Shemesh H, Steinberg D. Mercury release from dental amalgam after treatment with 10% carbamide peroxide in vitro. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 2000; 89: 216-219.
- Sallsten G, Thoren J, Barregard L, Schutz A, Skarping G. Long-term use of nicotine chewing gum and mercury exposure from dental amalgam fillings. *J Dent Res* 1996; 75: 594-598.
- Seale NS, McIntosh JE, Taylor AN. Pulpal reaction to bleaching of teeth in dogs. *J Dent Res* 1981; 60: 948 – 53.
- Siblerud RL. The relationship between mercury from dental amalgam and the cardiovascular system. *Sci Tot Environ* 1990; 99: 23-35.
- Siblerud RL, Kienholz E. Evidence that mercury from silver dental fillings may be an etiological factor in multiple sclerosis. *Sci Tot Environ* 1994; 15: 191-205.
- Söremark R, Wing K, Olsson K, Goldin J. Penetration of metallic ions from restorations into teeth. *J Pros Dent* 1968; 20 (6): 531-540.

- Steinberg D, Blank O, Rotstein I. Influence of dental biofilm on release of mercury from amalgam exposed to carbamide peroxide. *J Biomed Mater Res Part B: Appl Biomater* 2003; 67B: 627-631.
- Stohs SJ, Bagchi D. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radic Biol Med* 1995; 18 (2): 321-336.
- Sturm B, Lassacher U, Ternes N, Jallitsch A, Goldenber H, Scheiber- Mojdehkar B. The influence of Gallium and other metal ions on the uptake of non-transferrin-bound iron by rat hepatocytes. *Bioschim* 2006;*in press*.
- Suliaman M, Addy M, MacDonald E, Rees JS. The effect of hydrogen peroxide concentration on the outcome of tooth whitening: an in vitro study. *J Dent* 2004; 32: 295-299.
- Tang C, Yin C, Pei Y, Zhang M, Wu L. New superporous hydrogels composites based on aqueous Carbopol[®] solution (SPHCcs): synthesis, characterization and in vitro bioadhesive force studies. *Eur Polymer J* 2005; 41 (3): 557-562.
- Vimy MJ, Lorscheider FL. Dental amalgam mercury daily dose estimated from intra-oral vapor measurement: A predictor of mercury accumulation in human tissues. *J Trace Elem Exp Med* 1990; 3: 111-123.
- Wahl MJ. Amalgam - resurrection and redemption. Part 2: The medical mythology of anti-amalgam. *Quintessence Int* 2001; 32: 696-710.
- Ward JF. Molecular mechanisms of radical induced damage to nucleic acids. *Adv Radiat Biol* 1975; 5: 181-239.
- Wataha JC, Craig RG, Hanks CT. The release of elements of dental casting alloys into cell-culture medium. *J Dent Res* 1991; 70: 1014-8.
- Wataha JC, Lockwood PE. Release of elements from dental casting alloys into cell-culture medium over 10 months. *Dent Mater* 1998; 14: 158-163.
- Weiner JA, Nylander M. The relationship between mercury concentration in human organs and different predictor variables. *Sci Total Environ* 1993; 138: 101-115.
- Weitzman SA, Weitberg AB, Stossel TP, Schwartz j, Shklar, G. Effects of hydrogen peroxide on oral carcinogenesis in hamsters. *J Periodontol* 1986; 57: 685 – 688.
- Wells PG, Kim PM, Laposa RR, Nicol CJ, Parman T, Winn LM. Oxidative damage in chemical teratogenesis. *Mutat Res* 1997; 396: 65-78.

FIGURES

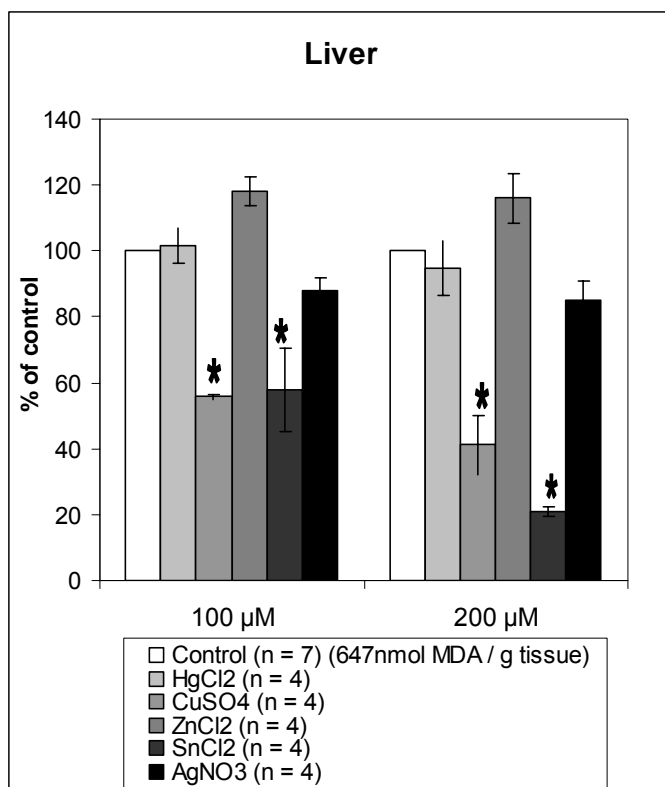


Fig. 1. Hepatic TBARS levels after incubation with amalgam metals constituents (F = 12,593; p = 0,000).

* Significant different from control.

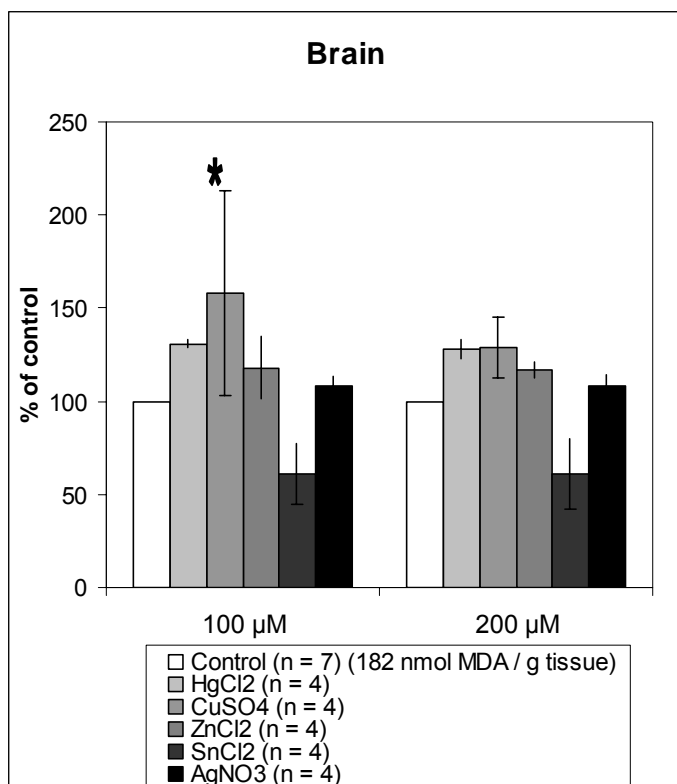


Fig. 2. Brain TBARS levels after incubation with amalgam metal constituents ($F = 2,691$; $p = 0,020$).

* Significant different from control.

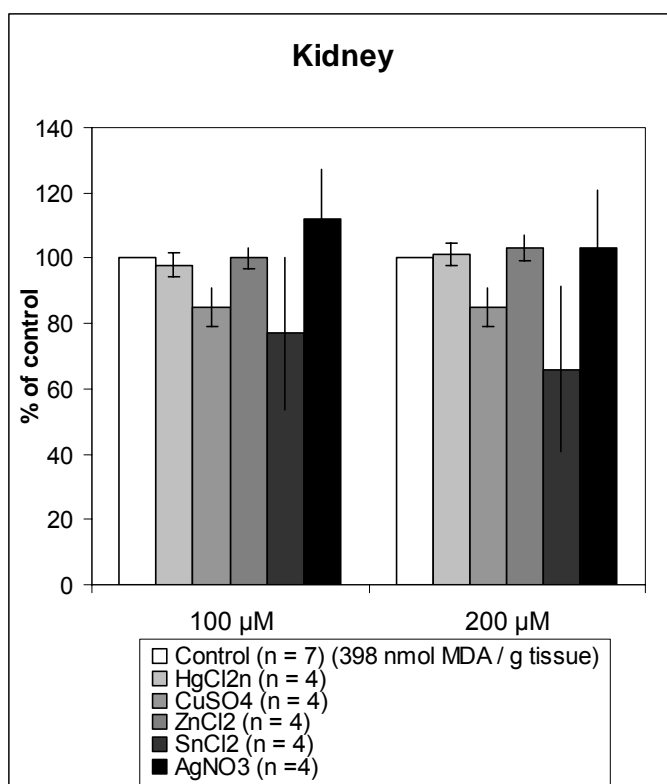


Fig. 3. Kidney TBARS levels after incubation with amalgam metal constituents (F = 1,281; p = 0,281).

* Significant different from control.

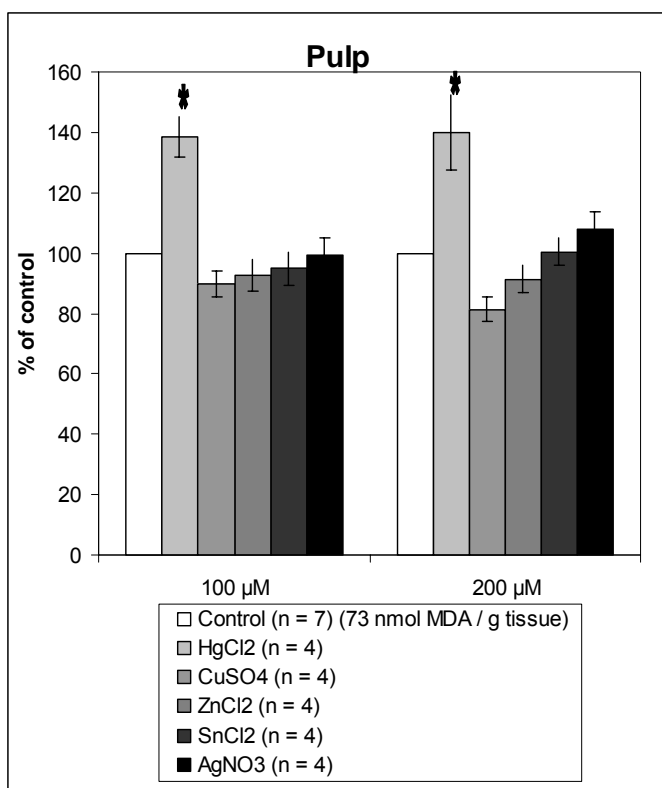


Fig. 4. Pulp TBARS levels after incubation with amalgam metal constituents (F = 6,183; p = 0,000).

* Significant different from control.

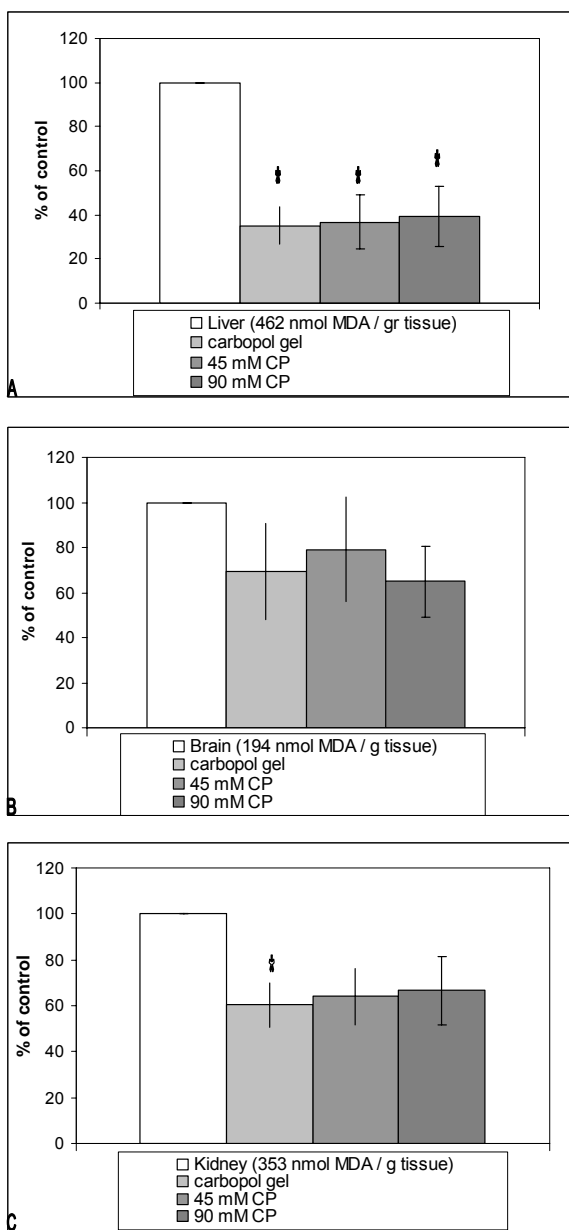


Fig. 5A-C. TBARS levels in some rat tissues after incubation of homogenates and with carbopol and CP. Liver (N = 4; F = 9,705; p = 0,002), brain (N = 4; F = 0,785; p = 0,525) and kidney (N = 4; F = 2,872; p = 0,103).

* Significant different from control.

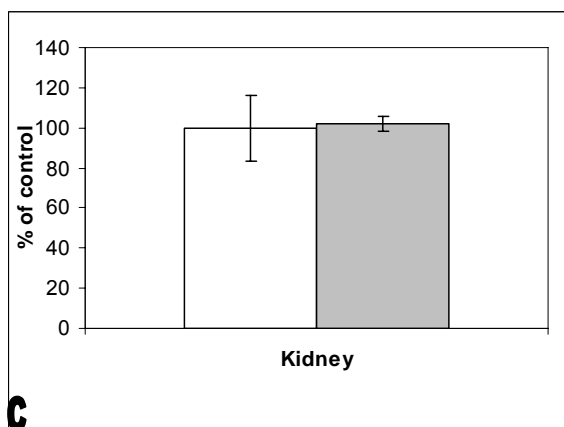
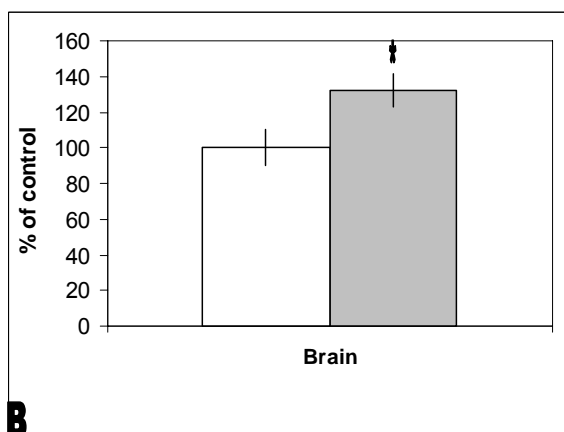
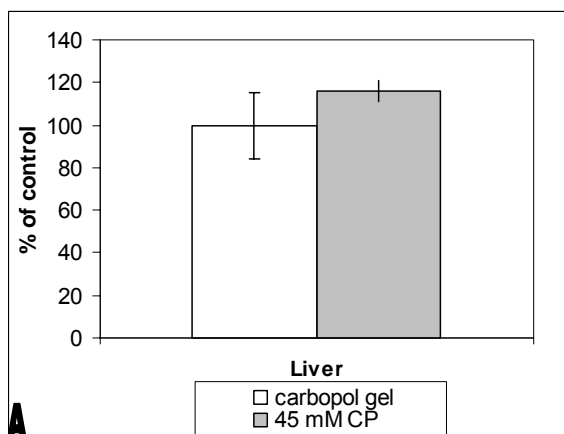


Fig. 6A-C. TBARS levels in some rat tissues after incubation of homogenates with carbopol and CP. Liver (N = 4; F = 0,057; p = 0,945), brain (N = 4; F = 5,291; p = 0,014) and kidney (N = 4; F = 0,087; p = 0,917).

* Significant different from control.

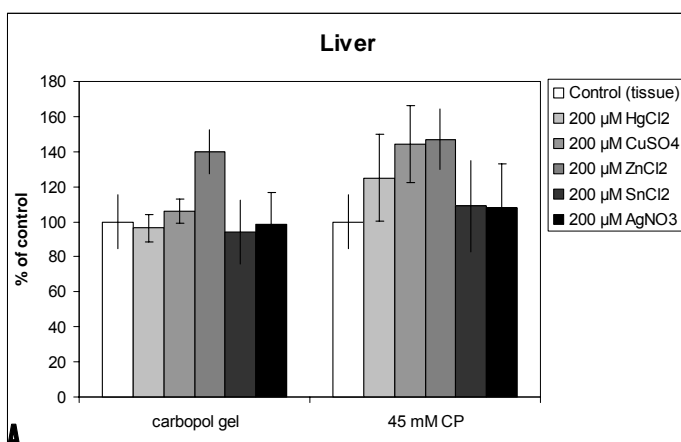


Fig. 7-A. Liver TBARS levels after incubation with carbamide peroxide dissolved in carbopol gel and dental amalgam components. (N = 3; F = 0,950; p = 0,521).

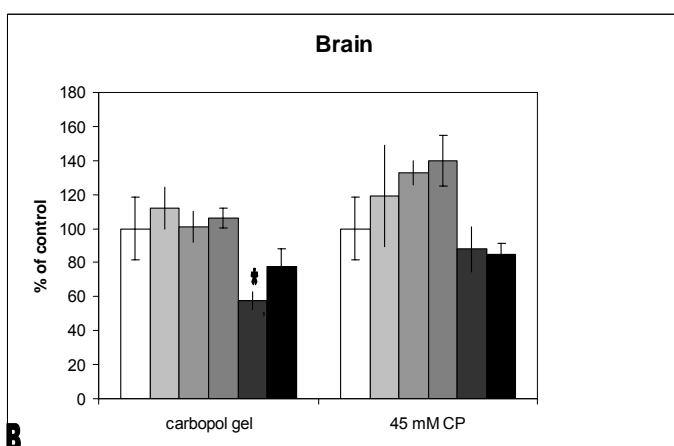


Fig. 7-B. Brain TBARS levels after incubation with carbamide peroxide dissolved in carbopol gel and dental amalgam components (N = 3; F = 3,684; p = 0,000).

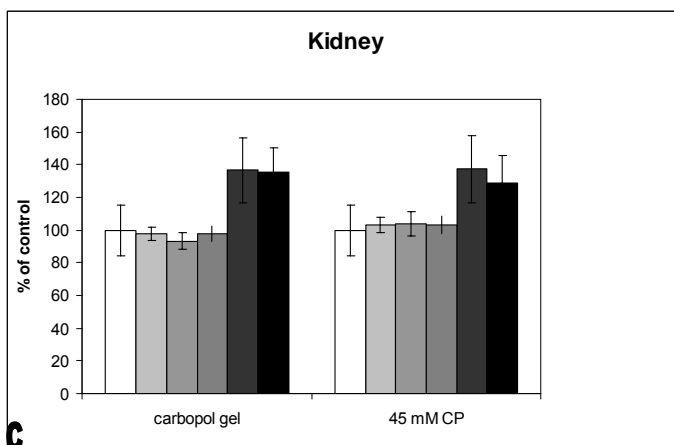


Fig. 7-C. Kidney TBARS levels after incubation with carbamide peroxide dissolved in carbopol gel and dental amalgam components (N = 3; F = 1,548; p = 0,138).

* Significant different from control.

4 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho permitem concluir que:

- A administração oral de peróxido de carbamida 24 e 35% ou gel carbopol por 25 dias não causa um aumento nos níveis de produção de TBARS nos tecidos hepático e pulpar de ratos *in vivo*.
- A enzima δ -ALA-D hepática de ratos não apresenta sensibilidade aos componentes do gel de clareamento dental (carbopol e peróxido de carbamida) nas concentrações utilizadas, ou aos seus produtos de degradação *in vivo*.
- A avaliação histológica do epitélio do palato dos ratos submetidos ao tratamento *in vivo* demonstra que o peróxido de carbamida 35% causa um aumento na sua espessura, aumento na dimensão (altura) das células basais, e aumento do número de camadas de células deste epitélio.
- O peróxido de carbamida causa um aumento nos níveis de TBARS *in vitro* apenas quando incubado em concentrações altas nos tecidos hepático e pulpar. No tecido cerebral, o poder indutor no aumento dos níveis de TBARS é acentuado, pois concentrações mais baixas deste composto já possuem efeito indutor neste parâmetro de toxicidade.
- O gel carbopol causa uma diminuição nos níveis de TBARS dos tecidos hepático, cerebral e renal quando comparado com os níveis produzidos pelo controle, onde somente o tecido foi utilizado *in vitro*.
- O efeito dos metais que constituem o amálgama dental sobre os níveis de TBARS *in vitro* nos tecidos é bastante diversificado: no tecido hepático o CuSO_4 e o SnCl_2 causam

uma diminuição na produção de TBARS nas concentrações estudadas, apesar de no cérebro, CuSO_4 causar um aumento nos níveis TBARS.

- SnCl_2 causa uma diminuição na produção de TBARS no cérebro quando incubado juntamente com o peróxido de carbamida *in vitro*.

- O tecido pulpar dental é suscetível à ação do HgCl_2 nas concentrações estudadas, pois esta substância causa um aumento nos níveis de TBARS, o que salienta a atenção necessária no procedimento de clareamento quando dentes restaurados com amálgama estão presentes na cavidade bucal.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKAL, N. *et al.* Effects of carbamide peroxide containing bleaching agents on the morphology and subsurface hardness enamel. **J. Clin. Pediatr. Dent.**, v. 25, p. 293-296, 2001.
- ALBUQUERQUE, R. C. *et al.* Efeito do peróxido de carbamida em mucosa bucal de ratos. **Anais da Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica**. Divisão Brasileira da IADR, São Paulo, p. 80, 1998.
- ASCHNER, M. Mercury toxicity. **J. Pediatr.**, v. 138, n. 3, p. 450-451, 2001.
- ATTIN, T. *et al.* Effect of bleaching on restorative materials and restorations - a systematic review. **Dent. Mater.**, v. 20, p. 852-861, 2004.
- BAER, K. N. Methylmercury. In: WEXLER, P. (Ed.) **Encyclopedia of toxicology**. San Diego, USA: Academic Press, v. 2, p. 314-316, 1998.
- BAILEY, S. J.; SWIFT JR., E. J. Effect of home bleaching products on composite resins. **Quintessence Int.**, v. 23, p. 489-94, 1992.
- BARATIERI, L. N. *et al.* Clareamento dental, Chicago: **Quintessence**, 1993.
- BARNARD, G. F. *et al.* Mechanism of porphobilinogen synthase – Possible role of essential thiol groups. **J. Biol. Chem.**, v. 252, p. 8965-8974, 1977.
- BARREIRO, O. L. C. 5-Aminolaevulinate hydro-lyase from yeast. Isolation and purification. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 139, p. 479-486, 1967.
- BATLLE, A. M. Del C.; FERRAMOLA, A. M.; GRINSTEN, M. Purification and general properties of delta-aminolaevulinate dehydratase from cow liver. **Biochem. J.**, v. 104, p. 244-249, 1967.
- BECHARA, E. J. H. *et al.* A free radical hypothesis of lead poisoning and in born porphyries associated with 5-aminolevulinic acid overload. **Quim. Nova**, v. 16, p. 385-392, 1993.
- BECKER, D. M.; VILJOEN, J. D.; KRAMER, S. The inhibition of red cell and brain ATPase by δ -aminolevulinic acid. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 255, p. 26-34, 1971.
- BERDOUSES, E. *et al.* Mercury release from dental amalgams: An in vitro study under controlled chewing and brushing in an artificial mouth. **J. Dent. Res.**, v. 74, p. 1185-1193, 1995.

- BERGDAHL, I. A. *et al.* Lead binding to δ -aminolevulinic acid dehydratase (ALAD) in human erythrocytes. **Pharmacol. Toxicol.**, v. 81, p. 153-158, 1997.
- BEVAN, D. R.; BODLAENDER, P.; SHEMIN, D. Mechanism of porphobilinogen synthase. Requirement of Zn^{2+} for enzyme activity. **J. Biol. Chem.**, v. 255, n. 5, p. 2030-2035, 1980.
- BONSIGNORE, D. L'attività ALA-deidratasica eritrocitaria quale test diagnostico nel saturnismo professionale. **Med. Lav.**, v. 57, p. 647-654, 1966.
- BORRALHO, L. M. *et al.* Purification of delta-aminolevulinato dehydratase from genetically engeneered yeast. **Yeast**, v. 6, p. 319-330, 1990.
- BOVERIS, A.; CHANCE, B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. **Biochem. J.**, v. 34, p. 707-17, 1973.
- BOVERIS, A.; CADENAS, E. Production of superoxide radicals and hydrogen peroxide in mitochondria. In: OBERLEY, L. W. **Superoxide Dismutase**, p. 159-168, v. 2, CRC, Boca Raton., 1982.
- BOWLES, W. H.; THOMPSON, L. R. Vital bleaching: the effects of heat and hydrogen peroxide on pulpal enzymes. **J. Endod.**, v.12, p. 108 – 12, 1986.
- BRENNAN, M. J. W.; CANTRILL, R. C. Delta aminolevulinic acid is a potent agonist for GABA autoreceptors. **Nature**, v. 280, p. 514-515, 1979.
- BRENNAN, M. J. W.; CANTRILL, R. C.; KRAMER, S. Effects of delta-aminolevulinic acid on GABA receptor binding in synaptic plasma membranes. **Int. J. Biochem.**, v. 12, p. 833-835, 1980.
- CANTONI, O.; EVANS, R. M.; COSTA, M. Similarity in the acute cytotoxic response of mammalian cells to mercury (II) and X-rays: DNA damage and glutathione depletion. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 108, p. 614-619, 1982.
- CANTONI, O.; COSTA, M. Correlations of DNA strand breaks and their repair with cell survival following acute exposure to mercury (II) and X-rays. **Mol. Pharmacol.**, v. 24, p. 84-89, 1983.
- CANTONI, O. *et al.* Characterization of DNA lesions produced by $HgCl_2$ in cell culture systems. **Chem. Biol. Interact.**, v. 49, p. 209-224, 1984a.
- CANTONI, O. *et al.* Mechanism of $HgCl_2$ cytotoxicity in cultured mammalian cells. **Mol. Pharmacol.**, v. 26, p. 360-368, 1984b.

- CASTELFRANCO, P. A.; BATLE, A. M. Aminolevulinate dehydratase: Properties y mechanism de acción. **N. Arch. Fac. Med.**, v.45, p. 61-70, 1983.
- CHANCE, B.; SIES, H.; BOVERIS, A. Hidroperoxide metabolism in mammalian organs. **Physiol. Rev.**, v. 59, p. 527-602, 1979.
- CHAUNDHRY, A. G.; GORE, M. G.; JORDAN, P. M. Studies on the inactivation of 5-aminolevulinate dehydratase by alkylation. **Biochem. Soc. Trans.**, 4, p. 301-303, 1976.
- CHEN, A.; NEILANDS, J. B. Zinc, an essential metal ion for beef liver delta-aminolevulinate dehydratase. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 55, p. 1060-1063, 1973.
- CHRISTENSEN, R. P. Tooth bleaching, home-use products – in vivo assays for presence of gel in trays. **CRA Newsletter**, v.13, p. 2, 1989.
- CHRISTIE, N. T. *et al.* Use of mammalian DNA repair-deficient mutans to assess the effects of toxic metal compounds on DNA. **Biochem. Pharmacol.**, v. 33, n. 10, p. 1661-1670, 1984.
- CHRISTIE, N. T. *et al.* Differences in the effects of Hg(II) on DNA repair induced in Chinese hamster ovary cells by ultraviolet or X-rays. **Mol. Pharmacol.**, v. 29, p. 173-178, 1986.
- CLARKSON, T. W. The pharmacology of mercury compounds. **Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v. 12, p. 375-406, 1972.
- CLARKSON, T. W. The toxicology of mercury. **Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.**, v. 34, n. 3, p. 369-403, 1997.
- CLARKSON, T. W.; MAGOS, L.; MYERS, G. J. Current Concepts: The toxicology of mercury – current exposures and clinical manifestations. **N. Engl. J. Med.**, v.349, p. 1731-1737, 2003.
- COBANKARA, F. K. *et al.* Effect of home bleaching agents on roughness and surface morphology of human enamel and dentine. **Int. Dent. J.**, v. 54, p. 211-218, 2004.
- COMPORTI, M. Glutathione depleting agents and lipid peroxidation. **Chem. Biol. Int.**, v. 72, p. 1-56, 1989.

- CUTLER, M. G.; MOORE, M. R.; EWART, F. G. Effects of δ -aminolevulinic acid administration on social behavior in the laboratory mouse. **Psychopharmacol.**, v. 61, p. 131-135, 1979.
- DAHLSTROM, S. W.; HEITHERSAY, G. S.; BRIDGES, T. E. Hydroxyl radical activity in thermo-catalytically bleached root-filled teeth. **Endod. Dent. Traumatol.**, v. 13, p. 119-125, 1997.
- DE GROOT, H.; LITTANER, A. Hypoxia, reactive oxygen and cell injury. **Free Rad. Biol. Med.**, v. 541-551, 1989.
- DENT, A. J. *et al.* Two different zinc sites in bovine 5-aminolevulinic acid dehydratase distinguished by extended X-ray absorption fine structure. **Biochem.**, v. 29, p. 7822-7828, 1990.
- DESESSO, J. M. *et al.* Assessment of the carcinogenicity associated with oral exposures to hydrogen peroxide. **Food Chem. Toxicol.**, v. 38, p. 1021-1041, 2000.
- DISHMAN, M. V.; COVEY, D. A.; BAUGHAN, L. W. The effects of peroxide bleaching on composite to enamel bond strength. **Dent. Mater.**, v. 10, p. 33-36, 1994.
- DRESEL, E. I. B.; FALK, J. E. Conversion of delta-aminolevulinic acid to porphobilinogen in a tissue system. **Nature**, v. 172, p. 1185, 1953.
- EICHHORN, G. L.; CLARK, P. G. The reaction of mercury (II) with nucleosides. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 85, n. 24, p. 4020-4024, 1963.
- EMANUELLI, T. *et al.* Effect of mercuric chloride intoxication and dimercaprol treatment on delta-aminolevulinic acid dehydratase from brain, liver and kidney of adult mice. **Pharmacol. Toxicol.**, v. 79, p. 136-143, 1996.
- EMANUELLI, T. *et al.* Inhibition of adenylate cyclase activity by 5-aminolevulinic acid in rat and human brain. **Brain Res.**, v. 868, p. 88-94, 2000.
- FINELLI, V. N. *et al.* Delta-aminolevulinic acid dehydratase, a zinc dependent enzyme. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 60, p. 1418-1424, 1974.
- FINELLI, V. N. *et al.* Interaction of zinc and lead on delta-aminolevulinic acid dehydratase. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 65, p. 303-311, 1975.
- FREITAS, A. J. *et al.* Effects of Hg^{2+} and CH_3Hg^+ on Ca^{2+} fluxes in rat brain microsomes. **Brain Res.**, v. 738, p. 257-264, 1996.

- FRIBERG, L.; VOSTAL, J. Mercury in the environment: an epidemiological and toxicological appraisal. Cleveland: **CRC Press**, 1972.
- FRIDOVICH, I. Hypoxia and oxygen toxicity. In: FAHN, S. et al., (ed), **Advances in Neurology**, p. 225-6, New York: Raven, 1979.
- FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase. **Adv. Enzymol.**, v. 58, p. 62-68, 1986.
- FURST, A. Metals. In: WEXLER, P., (Ed.) **Encyclopedia of Toxicology**. San Diego, USA: Academic Press, v. 2, p. 291-292, 1998.
- GARGIULO, A. W.; WENTZ, F. M.; ORBAN, B. Mitotic activity of human oral epithelium exposed to 30 percent hydrogen peroxide. **Oral Surg.**, v. 4, p. 474 – 92, 1961.
- GIBSON, K. D.; NEUBERG, A.; SCOTT, J. J. The purification and properties of delta-aminolevulinic acid dehydratase. **Biochem. J.**, v. 61, p. 618-629, 1955.
- GOERING, P. L.; FOWLER, B. A. Regulation of lead inhibition of delta-aminolevulinic acid dehydratase by a low molecular weight, high affinity renal lead-binding protein. **J. Pharmacol. Exp. Therap.**, v. 231, p. 66-71, 1984.
- GOERING, P. L.; FOWLER, B. A. Mechanism of renal lead-binding protein reversal of δ -aminolevulinic acid dehydratase inhibition by lead. **J. Pharmacol. Exper. Ther.**, v. 234, p. 365-371, 1985.
- GOERING, P. L.; MISTRY, P.; FOWLER, B. A. A low molecular weight lead-binding protein in brain attenuates lead inhibition of delta-aminolevulinic acid dehydratase: comparison with a renal lead-binding protein. **J. Pharmacol. Exp. Therap.**, v. 237, p. 220-225, 1986.
- GOERING, P. L. Lead protein interactions as a basis for lead toxicity. **Neurotoxicol.**, v. 14, p. 45-60, 1993.
- GOLDSTEIN, C. E.; GOLDSTEIN, R. E.; FEINMAN, R. A. Bleaching vital teeth: state of the art. **Quintessence Int.**, v. 10, p. 729 – 737, 1989.
- GOYER, R. A. Toxic effects of metals. In: KLAASSEN, C. D.; AMDUR, M. O. & DOULL, J. (Ed.) **Casarett and Doull's toxicology: the basic science of poisons**. 5th. United of America: The McGraw-Hill Companies. p. 691-712, 1996.
- GRANICK, J. L.; SASSA, S.; KAPPAS, A. Some biochemical and clinical aspects of lead intoxication. **Adv. Clin. Chem.**, p. 287-339, 1978.

- GRUENWEDEL, D. W.; DAVIDSON, N. Complexing and denaturation of DNA by methylmercuric hydroxide. I. Spectrophotometric studies. **J. Mol. Biol.**, v. 21, n. 1, p. 129-144, 1996.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine.** 3. ed. Oxford: Oxford University Press, 1998.
- HAYWOOD, V. B.; HEYMANN H. O. Nightguard vital bleaching. **Quintessence Int.**, v. 20, p. 173 – 176, 1989.
- HAYWOOD, V. B.; HEYMANN, H. O. Nightguard vital bleaching: how safe is it? **Quintessence Int.**, v. 22, p. 515-523, 1991.
- HAYWOOD, V. B. Bleaching of vital and non-vital teeth. **Curr. Opin. Dent.**, v. 2, p. 142-9, 1992.
- HERMES-LIMA, M. *et al.* Damage to rat mitochondria promoted by δ -aminolevulinic acid generated oxygen species: connections with acute intermittent porphyria and lead-poisoning. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1056, p. 57-63, 1990.
- HERNEBERG, S. *et al.* Delta-aminolevulinic acid dehydratase as a measure of lead exposure. **Arch. Environ. Health.**, v. 21, p. 140-145, 1970.
- HILL, E. F.; SOARES, J. H. Subchronic mercury exposure in Coturnix and a method of hazard evaluation. **Environ. Toxicol. Chem.**, v. 3, p. 489-502, 1984.
- HUMMERT, T. W. *et al.* Mercury in solution following exposure of various amalgams to carbamide peroxide. **Am. J. Dent.**, v. 6, p. 305-309, 1993.
- IVANOV, I. I. A relay model of lipid peroxidation in biological membranes. **J. Free Rad. Biol. Med.**, v. 1, p. 247-53, 1985.
- JAFFE, E. K. *et al.* 5-Chlorolevulinate modification of porphobilinogen synthase identifies a potential role for the catalytic zinc. **Biochem.**, v. 31 p. 2113-2123, 1992.
- JAFFE, E. K. Porphobilinogen synthase, the first source of heme's asymmetry. **J. Bioener. Biom.**, v. 27, n 2, p. 169-179, 1995.
- JAFFE, E. K. The porphobilinogen synthase family of metalloenzymes. **Acta Cryst.**, v. 56, p. 115-128, 2000.
- JONES, D. P. The role of oxygen concentration in oxydative stress: aging and hyperoxic models. In: SIES, H. (ed) **Oxidative Stress**, p. 151-195, London: Academic, 1985.

- KAO, E. C.; PENG, P.; JOHNSTON, W. M. Color changes of teeth and restorative materials exposed to bleaching. **J. Dent. Res.**, v. 70, p. 570, (Abstr. 24336), 1991.
- KAPPAS, A. *et al.* The Phorphyrins. In: SCRIVER, C. R. *et al.* **The metabolic bases of inherited disease**. New York: McGraw Hill, 1995. p. 2103-2160.
- KOSTYNIAK, P. J. Mercury as a potential hazard for the dental practitioner. **N. Y. State Dent. J.**, v. 64, n. 4, p. 40-43, 1998.
- LARSON, T. D. The effect of peroxides on teeth and tissue: review of the literature. **Northwest Dent.**, v. 69, n. 6, p. 29-32, 1990.
- LOBNER, D.; ASRARI, M. Neurotoxicity of dental amalgam is mediated by zinc. **J. Dent. Res.**, v. 82, p. 243-246, 2003.
- MAGOS, L.; HALBACH, S.; CLARKSON, T. W. Role of catalase in the oxidation of mercury vapor. **Biochem. Pharmacol.**, v. 27, p. 1373-1377, 1978.
- MARTIN J.H. *et al.* Cellular response of gingiva to prolonged application of dilute hydrogen peroxide. **J. Periodontol.**, v. 39, p. 208 – 210, 1968.
- McGILLION, F. B.; THOMPSON, G. G.; GOLDBERG, A. The passage of delta-aminolevulinic acid across the blood brain barrier of the rat: effect of ethanol. **Biochem. Pharmacol.**, v. 23, p. 472-474, 1974.
- McGILLION, F. B.; THOMPSON, G. G.; GOLDBERG, A. Tissue uptake of δ -aminolevulinic acid. **Biochem. Pharmacol.**, v. 24, p. 299-301, 1975.
- MEREDITH, P. A.; MOORE, M. R.; GOLDBERG, A. Erythrocyte ALA dehydratase activity and blood protoporphyrin concentrations as indices of lead exposure and altered haem biosynthesis. **Clin. Sci. Mol. Med.**, v. 56, p. 61-69, 1979.
- MITCHELL, R. A. *et al.* Erythrocyte porphobilinogen synthase (Delta-aminolaevulinic acid dehydratase) activity: a reliable and quantitative indicator of lead exposure in humans. **Clin. Chem.**, v. 23, p. 105-111, 1977.
- MITCHELL, L. W.; JAFFE, E. K. Porphobilinogen synthase from *Escherichia coli* in a Zn(II) metalloenzyme stimulated by Mg(II). **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 300, p. 169-177, 1993.
- MIYAMOTO, M. D. Hg^{2+} causes neurotoxicity at an intracellular site following entry through Na and Ca channels. **Brain Res.**, v. 267, p. 375-379, 1983.

- MONTEIRO, H. P. *et al.* Free radical generation during δ -aminolevulinic acid autoxidation: induction by hemoglobin and connections with porphyriopathies. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 271, n. 1, p. 206-216, 1989.
- NAKAO, K.; WADA, O.; YANO, Y. Delta-aminolevulinic acid dehydratase activity in erythrocytes for the evaluation of lead poisoning. **Clin. Chim. Acta.**, v. 19, p. 319-325, 1968.
- NELSON, H. M.; UGHES, M. A.; MEREDITH, P. A. Zinc, copper, and delta-aminolevulinic acid dehydratase *in vitro* and *in vivo*. **Toxicol.**, v. 21, p. 261-266, 1981.
- NORDBERG, G. F. Factors influencing metabolism and toxicity of metals: A consensus report. **Environ. Health Perspect.**, v. 25, p. 3-41, 1978.
- OEHME, F. Mechanisms of heavy inorganic toxicities. In: **Toxicity to heavy metals in the environment**, part 1, p. 69-86. New York: Marcel Dekker, 1978.
- ONOSAKA, S.; CHERIAN, M. G. The induces synthesis of metallothionein in various tissues of rat in response to metals. I. Effect of repeated injection of cadmium salts. **Toxicol.**, v. 22, p. 91-101, 1981.
- OTEIZA, P. I. *et al.* 5-Aminolevulinic acid induces iron release from ferritin. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 316, p. 607-611, 1994.
- PEIXOTO, N. C. **Atividade da enzima delta-aminolevulinato desidratase (δ -ALA-D (E.C.:4.2.1.24) como indicador da intoxicação de ratos jovens com metais pesados nas três principais fases de crescimento cerebral rápido pós-natal.** Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas – Bioquímica) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2000.
- PEIXOTO, N. C. *et al.* Effects of zinc and cadmium on HgCl₂-delta-ALA-D inhibition and Hg levels in tissues of suckling rats. **Toxicol. Lett.**, v. 146, n. 1, p. 17-25, 2003.
- PEREIRA, B. *et al.* Aminolevulinic acid-induced alterations of oxidative metabolism in sedentary and exercise-trained rats. **J. Appl. Physiol.**, v. 72, n. 1, p. 226-230, 1992.
- POZZOBON, R. T. **Análise da translucidez de materiais restauradores estéticos: efeito de agentes clareadores e tempo.** 213 p. Dissertação (Mestrado em Dentística Restauradora) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, São Paulo, 1998.

- PRYOR, W. A. Oxy-radicals and related species: their formation, lifetimes and reactions. **Annu. Rev. Physiol.**, v. 48, p. 657-667, 1986.
- ROBERTELLO, F. J. et al. Effect of home bleaching products on mercury release from an admixed amalgam. **Am. J. Dent.**, v. 12, p. 227-230, 1999.
- ROCHA, J. B. T. et al. Effects of methylmercury exposure during the second stage of rapid postnatal brain growth on negative geotaxis and on delta-aminolevulinic acid dehydratase of suckling rats. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 26, p. 1077-1083, 1993.
- ROCHA, J. B. T. et al. Effects of treatment with mercury chloride and lead acetate during the second stage of rapid postnatal brain growth on delta-aminolevulinic acid dehydratase (ALA-D) activity in brain, liver and blood of suckling rats. **Toxicol.**, v. 100, p. 27-37, 1995.
- RODRIGUES, A. L. S. **Delta-aminolevulinato desidratase (E. C.: 4.2.1.24) em sangue de *Pimelodus maculatus* (Pisces, Pimelodidae): características bioquímicas e efeito de metais pesados.** 172 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1987.
- RODRIGUES, A. L. S.; BELLINASSO, M. L.; DICK, T. Effect of some metal ions on blood and liver delta-aminolevulinic acid dehydratase of *Pimelodus maculatus* (Pisces, Pimelodidae). **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 94B, p. 65-69, 1989.
- RODRIGUES, J. A. et al. Microhardness evaluation of *in situ* vital bleaching on human dental enamel using a novel study design. **Dent. Mater.**, v. 21, p. 1059-1067, 2005.
- ROTSTEIN, A. Mercaptans, the biological targets for mercurials. In: MILLER, M W.; CLARKSON, T. W. **Mercury, Mercurials and Mercaptans.** Springfield, Ill.: Charles C. Thomas, 1971.
- ROTSTEIN, I. et al. Histochemical analysis of dental hard tissues following bleaching. **J. Endod.**, v. 22, p. 23 – 6, 1996.
- ROTSTEIN, I.; MOR, C.; ARWAZ, J. R. Changes in the surface levels of mercury, silver, tin and copper of dental amalgam treated with carbamide peroxide and hydrogen peroxide. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, v. 83, p. 506-509, 1997.

- ROTSTEIN, I. *et al.* Mercury release from dental amalgam after treatment with 10 percent carbamide peroxide in vitro. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, v. 89, p. 216-9, 2000.
- SALGADO, P. E. T.; LARINI, L. & LEPERA, J. S. Metals *In: LARINI, L. Toxicologia*. 1ª edição. São Paulo: Manole, cap. 5, p. 123-151, 1987.
- SASSA, S.; FUJITA, H.; KAPPAS, A. Genetic and chemical influences on heme biosynthesis. *In: Kotyk, A.; Skoda, J.; Paces V.; Kostka V. (Eds.), Highlights of Modern Biochemistry*, VSP, Utrecht, v. 1, p. 329-338, 1989.
- SEALE, N. S.; MCINTOSH, J. E.; TAYLOR, A. N. Pulpal reaction to bleaching of teeth in dogs. **J. Dent. Res.**, v. 60, p. 948 – 53, 1981.
- SHANKER, G.; ASCHNER, M. Identification and characterization of uptake systems for cystine and cysteine in cultured astrocytes and neurons: evidence for methylmercury-targeted disruption of astrocyte transport. **J. Neurosci. Res.**, v. 66, n. 5, p. 998-1002, 2001.
- SHEMIN, D. 5-Aminolevulinic acid dehydratase: structure, function and mechanism. **Phil. Trans. R. Soc. Lond.**, v. 273B, p. 109-115, 1976.
- SHIBATA, H.; OCHIAI, H. Purification and properties of delta-aminolevulinic acid dehydratase from radish cotyledons. **Plant & Cell Physiol.**, v. 18, p. 421-429, 1977.
- SIGNORINI, R.; SIGNORINI, R. Atividade física e radicais livres. *In: GOHAYEB, N.; BARROS, T. (ed). O Exercício: preparação fisiológica, avaliação médica, aspectos gerais e preventivos*. São Paulo: Atheneu, 1995.
- SINENSKY, M. C.; LEISER, A. L.; BABICH, H. Oxidative stress aspects of the cytotoxicity of carbamide peroxide: in vitro studies. **Toxicol. Lett.**, v. 75, p. 101-109, 1995.
- SOUZA, M. A. L. **Clareamento caseiro de dentes: ação do peróxido de carbamida sobre dentes e mucosa bucal**. 234 p. Tese (Doutorado em Odontologia) - Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1993.
- SPENCER, P.; JORDAN, P. M. Investigation of the nature of the two metal-binding sites in 5-aminolaevulinic acid dehydratase from *Escherichia coli*. **Biochem. J.**, v. 300, p. 373-381, 1994.

- STACEY, N. H.; KLAASSEN, C. D. Comparison of the effects of metals on cellular injury and lipid peroxidation in isolated rat hepatocytes. **J. Toxicol. Environ. Health**, v. 7, p. 139-148, 1981.
- STACEY, N.; KAPPUS, H. Cellular toxicity and lipid peroxidation in response to mercury. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 63, p. 29-35, 1982.
- STEINBERG, D.; BLANK, O.; ROTSTEIN, I. Influence of dental biofilm release of mercury from amalgam exposed to carbamide peroxide. **J. Biomed. Mater. Res. Part B: Appl Biomater.**, v. 67B, p. 627-631, 2003.
- SULIEMAN, M. *et al.* The effect of hydrogen peroxide concentration on the outcome of tooth whitening an in vitro study. **J Dent.**, v. 32, p. 295 – 299, 2004.
- SWIFT JR., E. A method for bleaching discolored vital teeth. **Quintessence Int.**, v. 19, p. 607-12, 1988.
- SWIFT JR., E.; PERDIGÃO, J. Effects of bleaching on teeth and restorations. **Compend. Contin. Educ. Dent.**, v. 19, p. 815-820, 1998.
- TAMAI, H.; SHIOI, Y.; SASA, T. Purification and characterization of delta-aminolevulinic acid dehydratase from *Chlorella regularis*. **Plant & Cell Physiol.**, v. 20, n. 2, p. 435-444, 1979.
- TIGIER, H. A.; BATLLE, A. M. del C.; LOCASCIO, G. A. Porphyrin biosynthesis in the soybean callus tissue system. II. Improved purification and some properties delta-aminolaevulinic acid dehydratase. **Enzymologia**, v. 38, p. 43-56, 1970.
- TIMBRELL, J. A. **Principles of Biochemical Toxicology**. Second Edition. Taylor & Francis London, Washington DC., P. 180, 1991.
- TIPTON, D. A.; BRAXTON, S. D.; DABBOUS, M. Kh. Effects of a bleaching agent on human gingival fibroblasts. **J. Periodontol.**, v. 66, n. 1, p. 766-774, 1995.
- TRAVACIO, M.; LLESUY, S. Antioxidant enzymes and their modification under oxidative stress conditions. **Adv. Sci.**, v. 48, n. 1/2, p. 9-13, 1996.
- TSUKAMOTO, I.; YOSHINAGA, T.; SANO, S. The role of zinc with special reference to the essencial thiol group in delta-aminolevulinic acid dehydratase of bovine liver. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 570, p. 167-178, 1979.
- VALLEE, B. L. & ULMER, D. D. Biochemical effects of mercury, cadmium and lead. **Ann. Rev. Biochem.**, v. 41, p. 91-128, 1972.

- VAN OIJEN, M. G. C. T. *et al.* Increased number of proliferating cells in oral epithelium from smokers and ex-smokers. **Oral Oncol.**, v. 34, p. 297-303, 1998.
- YALCIN, F.; GURGAN, S. Effect of two different bleaching regimens on the gloss of tooth colored restorative materials. **Dent. Mater.**, V. 21, P. 464-468, 2005.
- WAHL, M. J. Amalgam - resurrection and redemption. Part 2: The medical mythology of anti-amalgam. **Quintessence Int.**, v. 32, p. 696-710, 2001.
- WARREN, M. J. *et al.* Lead poisoning, haem synthesis and 5-aminolaevulinic acid dehydratase. **TIBS**, v.23, p. 217-221, 1998.
- WEITZMAN, S.A. *et al.* Effects of hydrogen peroxide on oral carcinogenesis in hamsters. **J. Periodontol.**, v. 57, p. 685 – 688, 1986.
- WHO Environmental Health Criteria 118: **Inorganic Mercury**, Geneva, World Health Organization, 167 pp., 1991.
- WIGFIELD, D. C.; FARANT, J. P. Factors influencing the pH-activity relationship of δ -aminolevulinic acid dehydratase from human blood, and their relevance to blood lead assay. **J. Anal. Toxicol.**, v. 3, p. 161-168, 1979.
- WILSON, E. L.; BURGER, P. E.; DOWDLE, E. B. Beef-liver 5-aminolevulinic acid dehydratase – Purification and properties. **Eur. J. Biochem.**, v. 29, p. 563-571, 1972.
- ZALKIND, M. *et al.* Surface morphology changes in human enamel, dentin and cementum following bleaching: a scanning electron microscopy study. **Endod. Dent . Traumatol.**, v. 12, p. 82-88, 1996.
- ZALUPS, R. K.; BARFUSS, D. W. Accumulation of inorganic mercury along the proximal tubule of the rabbit. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 106, p. 245-253, 1990.
- ZALUPS, R. K. Method for studying the in vivo accumulaltion of inorganic mercury in segments of the nephron in the kidneys of rats treated with mercury chloride. **J. Pharmacol. Method.**, v. 26, p. 89-104, 1991.

ANEXOS

MINISTÉRIO DA SAÚDE – CONSELHO NACIONAL DE SAÚDE
 COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA – CONEP/MS
 COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – UFSM

EXPEDIENTE N°. 23081.007953/2004-11

REGISTRO CEP/UFSM: 017/2004

I – Identificação

Título do Projeto: Efeito das diferentes concentrações do peróxido de carbamida e dos metais do amálgama dental nos níveis de TBARS hepático, renal e pulpar e na atividade da enzima ALA-D hepática de ratos
 Pesquisador Responsável: FERNANDA NEISSE
 Instituição: UFSM
 Área Temática: BIOQUÍMICA/TOXICOLOGIA
 Data entrada CEP: 04.08.2004
 Data aprovação CEP: 1º/10/04
 Data encaminhamento CONEP (caso necessário)

II – Objetivos:

Primário:

O propósito principal deste projeto é avaliar o possível efeito tóxico do peróxido de carbamida e dos componentes do amálgama dental, assim como verificar um possível ação do peróxido de carbamida na atividade da enzima ALA-D em diferentes tecidos de ratos.

Secundários: 1) Avaliar o dano oxidativo dessas substâncias no tecido hepático renal e pulpar de ratos;
 2) Avaliar a atividade da enzima ALA-D hepática;
 3) Avaliar microscopicamente a ação dessas substâncias nocivas no tecido pulpar.

III – Sumário:

O presente projeto visa a acompanhar o possível efeito tóxico do peróxido de carbamida e dos componentes do amálgama dental sobre os tecidos pulpar, hepático e renal de ratos, assim como verificar um a possível ação do peróxido de carbamida na atividade da ALA-D hepática.

Amostra: amostra será composta por ratos Wistar machos provenientes do Biotério: Central da UFSM – número aproximado de 50 animais

Critérios de Inclusão e Exclusão:

- 1) Metodologia: adequada – os estudos serão tanto in vitro quanto in vivo, onde serão investigados os efeitos do peróxido de carbamida e de componentes da amálgama sobre os tecidos hepáticos, renais e pulpare dos ratos.
- 2) Métodos Estatísticos: adequado – os resultados obtidos serão comparados por análise de variância de uma via se estes mostrarem distribuição normal, com análise de covariância quando for apropriado. Caso o F seja significativo ($p < 0.05$) será aplicado o teste de Duncan como contraste.

Parecer 017/2004

2

Termo de Consentimento Livre Esclarecido: não se aplica
Orçamento Detalhado: adequado com valor total de R\$ 2.075,00
Cronograma (Fluxograma) de Realização das Atividades: adequado, com duração de 2 anos
Currículo do Pesquisador: adequado, tendo publicações e formação de pessoal na área.

IV – Parecer:

O presente projeto poderá ser útil para se compreender os efeitos adversos oriundos dos procedimentos de clareamento dentário. Dessa forma, colaborando com o entendimento dos efeitos tóxicos locais e sistêmicos dos materiais empregados nesse procedimento. Visando com isso, a diminuir no futuro, os riscos para os pacientes.

SITUAÇÃO: APROVADO

L

Santa Maria, 1º de outubro de 2004.



Prof. Dr. Ricardo Bins Di Napoli,
Coordenador.