

**CITOTOXICIDAD DE UNA TIRA BLANQUEADORA CON 10% DE PERÓXIDO DE HIDROGENO SOBRE CÉLULAS EPITELIALES.**  
**CYTOTOXICITY OF A BLEACHING STRIP WITH 10% HYDROGEN PEROXIDE ON EPITHELIAL CELLS.**

Ferreira E.A.<sup>1</sup>, de Oliveira C. C.<sup>1</sup>, Soares D. G.<sup>2</sup>, Ortecho U.<sup>3</sup>, de Alencar M. L.<sup>4</sup>, Hebling J.<sup>5</sup>, de Souza C.A.<sup>6</sup>

- 1 Estudiante de doctorado en Rehabilitación Oral, Facultad de Odontología de Araraquara, Universidade Estadual Paulista – UNESP, Rua Humaitá, 1680, Araraquara, SP, 14801-903, Brasil
- 2 Investigador en el Laboratorio de Patología Experimental y Biomateriales, Departamento de Fisiología y Patología, Facultad de Odontología de Araraquara, Universidade Estadual Paulista – UNESP, Rua Humaitá, 1680, Araraquara, SP, 14801-903, Brasil.
- 3 Estudiante de maestría en Rehabilitación Oral, Facultad de Odontología de Araraquara, Universidade Estadual Paulista – UNESP, Rua Humaitá, 1680, Araraquara, SP, 14801-903, Brasil.
- 4 Maestro en Rehabilitación Oral, Facultad de Odontología de Araraquara, Sao Paulo Universidad Estatal - UNESP, Rua Humaitá, 1680, Araraquara, SP, 14801-903, Brasil
- 5 Profesor titular, Departamento de Ortodoncia y Clínica infantil, Facultad de Odontología de Araraquara, Universidade Estadual Paulista – UNESP, Rua Humaitá, 1680, Araraquara, SP, 14801-903, Brasil.
- 6 Profesor titular, Departamento de Fisiología y Patología, Facultad de Odontología de Araraquara, Universidade Estadual Paulista – UNESP, Rua Humaitá, 1680, Araraquara, SP, 14801-903, Brasil.

Volumen V1. Número 3. Septiembre - Diciembre 2017

## RESUMEN

**Objetivo:** El objetivo del presente estudio fue evaluar la citotoxicidad de una tira blanqueadora (TB) con un 10% de peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) sobre queratinocitos humanos in vitro.

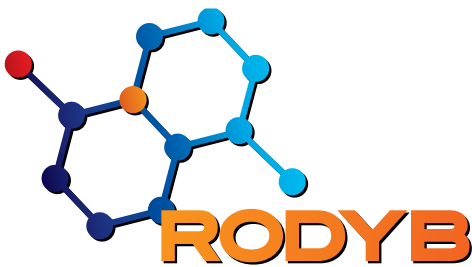
**Material y método:** Discos con 5.2 mm de diámetro de la TB se colocaron en compartimentos que contenían medio de cultivo (DMEM) seguido de incubación por 30 minutos a 37°C (TB 10%). A continuación, el medio de cultivo que contenía los productos liberados por la CB (extracto) se aplicó sobre las células HaCat por 1 hora. En los grupos control positivo (PH 35%) y negativo (CN), las células fueron incubadas en DMEM conteniendo o componentes de un gel blanqueador con 35% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, respectivamente. Después del período de incubación con los extractos, las células fueron analizadas en cuanto a la viabilidad (prueba de MTT) y morfología (MEV), siendo el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> liberado

cuantificado (violeta leuco-cristal / peroxidasa) (Kruskal-Wallis / Mann-Whitney;  $\alpha = 5\%$ ).

**Resultados:** Se observó una reducción significativa en torno al 96.6% y el 68.0% en la viabilidad de las células en los grupos PH 35% y TB 10%, respectivamente, en relación a la CN ( $p < 0.05$ ), siendo la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aproximadamente 4,5 veces superior en el grupo PH 35% en comparación con el grupo CB 10% ( $p < 0.05$ ). En ambos grupos expuestos a los extractos que contenían componentes de los geles blanqueadores, hubo reducción del número de células adheridas en el sustrato de cultivo, siendo que las células remanentes presentaron alteraciones morfológicas en comparación con CN.

**Conclusión:** El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> liberado a partir de cintas blanqueadoras presenta potencial para causar un intenso efecto citotóxico sobre queratinocitos humanos in vitro.

**Palabras clave:** Citotoxicidad; blanqueamiento dental; células epiteliales.



## Abstract

**Objective:** The objective of the present study was to evaluate the cytotoxicity of a bleaching strip (TB) with 10% hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) on human keratinocytes in vitro.

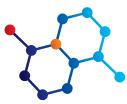
**Material and method:** Discs with 5.2 mm diameter TB were placed in compartments containing culture medium (DMEM) followed by incubation for 30 minutes at 37 °C (TB 10%). Thereafter, the culture medium containing the products released by the CB (extract) was applied to the HaCat cells for 1 hour. In the positive (PH 35%) and negative (CN) control groups, the cells were incubated in DMEM contains or bleaching gel with 35% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, components respectively. After the incubation period with the extracts included, the cells were analyzed for viability (MTT test) and morphology (MEV), been the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> released quantified (leuco-crystal violet / peroxidase) (Kruskal-Wallis / Mann-Whitney;  $\alpha = 5\%$ ).

**Results:** A significant reduction between 96.6% and 68.0% in cell viability was observed in the groups PH 35% and TB 10%, respectively, in relation to CN ( $p < 0.05$ ). Been the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentration approximately 4.5 times higher in the PH 35% group compared to the CB 10% group ( $p < 0.05$ ). In both groups exposed to the extracts containing components of the bleaching

gels, there was a reduction in the number of cells adhered in the culture substrate, and the remaining cells presented morphological alterations compared to CN.

**Conclusion:** The H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> released from bleaching tapes has the potential to cause an intense cytotoxic effect on human keratinocytes in vitro.

**Keywords:** Cytotoxicity; teeth whitening; epithelial cells.



## INTRODUCCIÓN

Los productos blanqueadores utilizados en la actualidad para las técnicas caseras y de consultorio, se basan en la capacidad del peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) para oxidar moléculas orgánicas de la estructura del diente<sup>1,2</sup>. Sin embargo, debido al alto potencial de oxidación del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, este contacto molécula con tejidos biológicos durante el blanqueo es el principal punto de interrogación de las diversas técnicas de blanqueo, desde que fue reportado que el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es capaz de causar cambios significativos en diversos tipos de células, tales como células epiteliales, conectivo, hueso y la pulpa dental<sup>3,1,2,4</sup>.

Clínicamente, se sabe que la sensibilidad dental y la irritación gingival son los principales efectos adversos de las terapias de blanqueo<sup>5,6</sup>, las cuales son causadas por el daño oxidativo a las células de la mucosa oral y el tejido conectivo pulpar mediadas por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, cuya intensidad es proporcional a la dosis empleada en producto de blanqueamiento y el tiempo de exposición de la estructura dental<sup>7,8,9,10,11,12,13</sup>. Por lo tanto, hasta el presente, el blanqueo con geles a base de peróxido carbamida (PC) al 10% ha sido considerado como la técnica que ofrece menos riesgo para el tejido oral debido a la liberación lenta y controlada de bajas concentraciones H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (<sup>14,15</sup>). Sin embargo, la técnica casera todavía presenta limitaciones, las cuales están directamente relacionadas con el riesgo de fuga de material blanqueador para los tejidos gingivales y periodontales (<sup>16</sup>). Para minimizar estos riesgos, la técnica casera supervisada emplea bandejas personalizadas confeccionadas por el dentista, lo que minimiza el riesgo de contacto del producto en las zonas de tejido blando (<sup>16</sup>). En contraste, muchos productos de blanqueamiento están disponibles directamente para el consumidor (over-the-counter - OTC), que utilizan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> principio como activa, sin, sin embargo, proporcionar estrategias apropiadas de protección de los tejidos gingivales y periodontales (<sup>7,17</sup>).

Entre los medicamentos de venta libre, las tiras blanqueadoras (TB) han ganado popularidad debido al bajo costo, facilidad de manejo y el hecho de que no hay necesidad de utilizar bandejas<sup>7,17</sup>. Los estudios clínicos muestran eficacia blanqueadora similar al blanqueamiento casero con PC al 10%, asociado con bajos niveles de sensibilidad dental<sup>17,18,19,20,21</sup>. En un estudio realizado por Soares et al. <sup>22</sup>, se observó ausencia de citotoxicidad trans-amelodentinaria sobre células de odontoblastoides MDPC-23 después de dos aplicaciones de una cinta de 30 minutos con al 10% sobre discos de esmalte/dentina. Sin embargo, existe una gran preocupación acerca de los posibles efectos tóxicos sobre las células de la mucosa oral, ya que estos sistemas no son individualizados para el arco dental del paciente, dando como resultado el contacto directo entre la papila gingival con la superficie de la tira de blanqueadora que contiene el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>16</sup>. Por lo tanto, este estudio evaluó los efectos citotóxicos de los productos liberados a partir de una TB con 10% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sobre células epiteliales in vitro.

## MATERIAL Y MÉTODO

**Cultivo celular:** Las células inmortalizadas de queratinocitos humanos (HaCaT) se cultivaron en medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, SIGMA Chemical Co., St. Louis, MO,

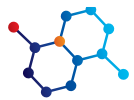
EE.UU.) que contenía suero bovino fetal al 10% (FBS; GIBCO, Grand Island, NY, EE.UU.), 100 IU / ml y 100 µg/ ml, respectivamente, penicilina y estreptomocina y 2 mmol/L glutamina (GIBCO) en una atmósfera humidificada a 37° C con 5% de CO<sub>2</sub>. Para realizar el ensayo de citotoxicidad, 12,500 células/cm<sup>2</sup> se sembraron en placas de acrílico de 24 compartimentos (Costar Corp., Cambridge, MA, EE.UU.) y se mantuvieron en una incubadora a 37° C y 5% de CO<sub>2</sub> durante 72 horas para obtener un patrón de 100% de confluencia.

**Diseño experimental:** En la campana de flujo laminar, se obtuvieron los discos con 5,2 mm de diámetro de la tira de blanqueadora (TB; Blanco Cresta de 3D, Advanced Vivid Procter & Gamble, Cincinnati, OH, EE.UU.), cada disco (n = 10) fue colocado individualmente en placas de 24 compartimentos (Costar Corp.) que contenían 1 ml de DMEM sin FBS. El conjunto se mantuvo durante 30 minutos en una incubadora a 37 C y 5% de CO<sub>2</sub>. Después de este período, se colectó el medio de cultivo, y que desde ahora se llamará extracto. Un total de 500 µL de los extractos, que se caracterizaron por estar compuestos de medio de cultivo, más los componentes liberados de la TB, se aplicaron sobre las células HaCat previamente cultivadas. El extracto se mantuvo en contacto con las células durante 1 hora en una incubadora, a temperatura de 37° C con 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de aire. Después, las células se lavaron con PBS (solución tampón de fosfato) y entonces se realizó el análisis de la viabilidad celular y morfología. Como un control positivo, un total de 40 µL un gel blanqueador con 35% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Whiteness HP 35%; FGM, Joinville, Brasil) se disolvió en medio de cultivo y se aplicó sobre las células durante 1 hora. En el grupo control negativo, las células se incubaron en DMEM sin SFB. Los grupos experimentales se describen en la Tabla 1.

| GRUPOS                       | COMPOSICIÓN DEL EXTRACTO   |
|------------------------------|--|
| CN<br>(control negativo)     | DMEM sin SFB   |
| PH 35%<br>(Control positivo) | DMEM sin SFB +<br>40 µL del gel 35% de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>     |
| TB 10%                       | DMEM sin SFB +<br>Componentes de la TB 10% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> |

Tabla 1- Distribución de los grupos experimentales (n = 10).

**Evaluación de la viabilidad celular (ensayo MTT):** El análisis de la actividad celular metabólica se evaluó mediante la demostración citotóxica de la deshidrogenasa succínica, que representa la tasa de la respiración mitocondrial de las células. Después de la incubación de las células con los extractos (n = 10), esta solución se aspiró y



900  $\mu\text{L}$  de DMEM que contenía medio de cultivo y 100  $\mu\text{L}$  de MTT (Metiltetrazolium; Sigma Chemical Co.) a una concentración de 5 mg/ml de PBS, y se aplicó en cada compartimiento con el fin de identificar las células viables por la división de los anillos de tetrazolio. Las células se incubaron durante unas 4 horas más a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. A continuación, el medio de cultivo con una solución de MTT se aspiró y se reemplazó con 600  $\mu\text{L}$  de solución de isopropanol acidificado en HCl a 0.04 N para solubilizar los cristales formados por la degradación de los anillos de tetrazolio. Luego, tres alícuotas de 100  $\mu\text{L}$  se transfirieron a placas de 96 compartimentos (Costar Corp., Cambridge, MA, EE.UU.). La viabilidad celular se evaluó en proporción a la absorbancia determinada a 570 nm en un lector de ELISA (TP-Reader - ThermoPlate, Nanshan District, Shenzhen, China), el control negativo fue considerado como viabilidad celular al 100%.

**Cuantificación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> presente en los extractos:** Se recogió una alícuota de 100  $\mu\text{L}$  de medio de cultivo en contacto con las células ( $n = 10$ ) después del blanqueamiento y se transfirió a tubos que contenían 900  $\mu\text{L}$  de solución tampón de acetato (2 M, pH 4.5). Y luego 500  $\mu\text{L}$  de esta solución se transfirieron a tubos que contenían agua y colorante violeta leucocristal (0.5 mg/ml; Sigma Chemical Co.). Después los tubos se agitaron, y se les añadió 50  $\mu\text{L}$  de solución de enzima peroxidasa horseradish a 1 mg/ml (SIGMA

Chemical Co.). La absorbancia de la solución resultante fue medida por espectrofotómetro en una longitud de onda de 596 nm. Una curva de cantidades estándar conocidas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se usó para convertir los valores de densidad óptica obtenidos a partir de muestras en  $\mu\text{g}$  de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por ml de extracto.

**Análisis de la morfología celular:** El análisis de la morfología de las células ( $n = 2$ ) se realizó en células adheridas a cubreobjetos de vidrio, que se colocaron en la parte inferior de placas de 24 compartimentos antes del cultivo celular. Los extractos se aplicaron de la misma manera descrita anteriormente y fueron incubados durante 1 hora. Después de este período, las células que permanecieron adheridas a los portaobjetos de vidrio se fijaron con glutaraldehído tamponado al 2.5% (Sigma Chemical Co.). A continuación, los cubreobjetos se lavaron con PBS, y las células fueron fijadas de nuevo usando tetróxido de osmio (Sigma Chemical Co.) al 1%, se deshidrataron en soluciones de etanol en concentraciones decrecientes (100%; 95%; 70%; 30%; Sigma Chemical Co.), y finalmente fijadas en HMDS (Hexamethyldisilazane; Sigma Chemical Co.). Los portaobjetos fueron entonces colocados en soportes metálicos, mantenidas en desecador al vacío por un período de 72 horas a temperatura ambiente y fueron finalmente metalizadas en oro. La morfología celular se evaluó por microscopía electrónica de barrido (SEM, Philips FEG XL 30, Oxford, EE.UU.).

| GRUPO  | PROTOCOLOS EXPERIMENTALES       |   |
|--------|---------------------------------|---|
|        | VIAVIDAD CELULAR %              | CUANTIFICACIÓN DE H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) |
| CN     | 100.0 (97.8/102.2) <sup>a</sup> | N.D.*   |
| PH 35% | 3.4 (0.1/4.5) <sup>c</sup>      | 1.994 (1.956/1.999) <sup>b</sup>  |
| TB 10% | 32.0 (27.0/35.2) <sup>b</sup>   | 8.953 (8.840/9.086) <sup>a</sup>  |

**Tabla 2-** Datos de viabilidad celular e cuantificación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en los extractos para cada grupo experimental. Números representan mediana (percentil 25/percentil 75). Kruskal-Wallis/Mann-Whitney ( $n = 10$ ).

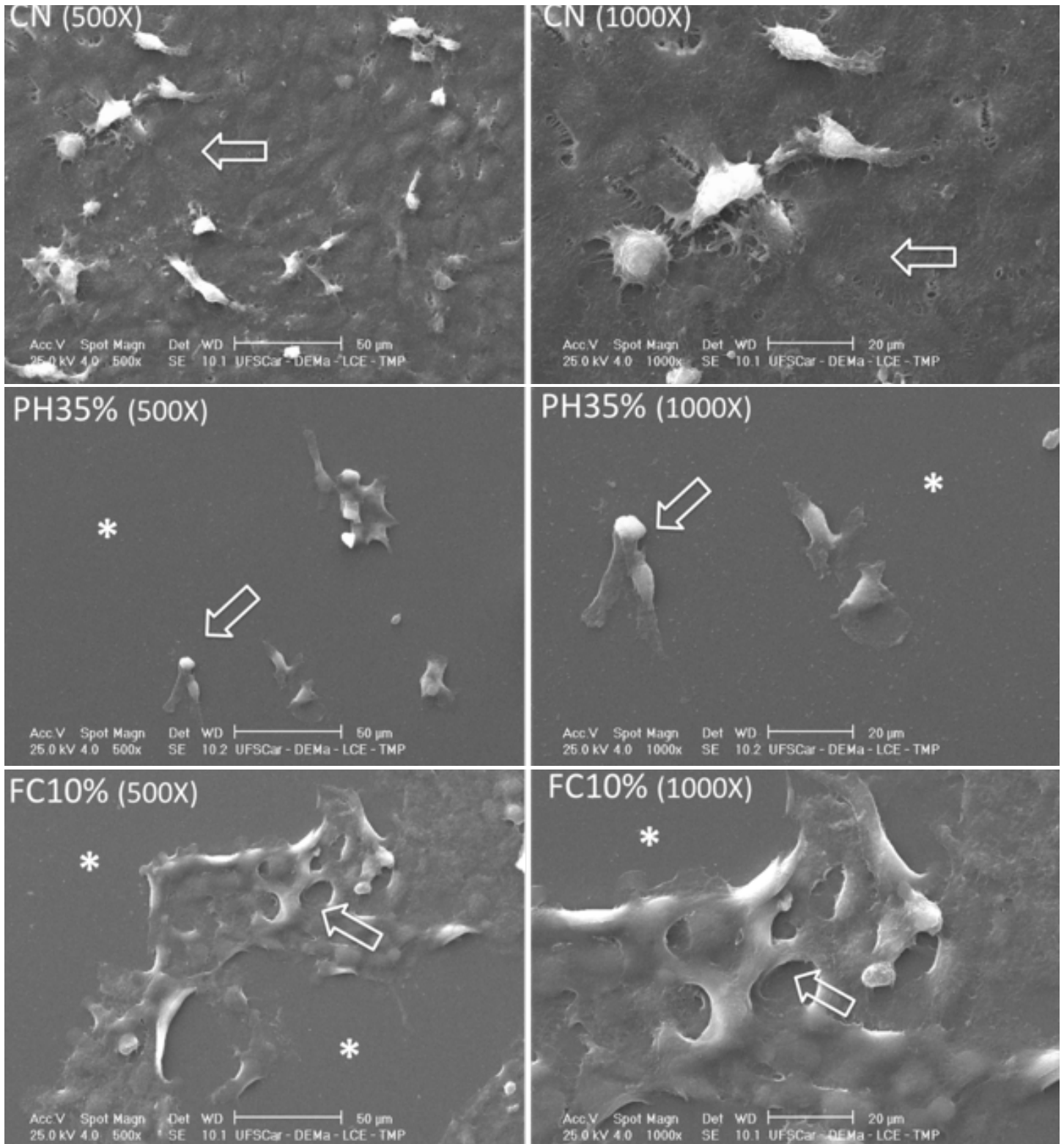
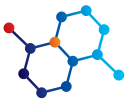
\*n.d. = no identificado

Dentro de cada columna, los grupos identificados con la misma letra no presentan diferencia estadística significativa ( $p < 0.05$ ).

## RESULTADOS

Los resultados de la viabilidad celular y cuantificación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se muestran en la Tabla 2. Se observó una reducción significativa alrededor de 96.6% y 68.0% en la viabilidad de las células HaCaT en grupos PH 35% y TB 10%, respectivamente, en comparación a CN ( $p < 0.05$ ). Se observó una diferencia significativa entre los grupos PH 35% y TB 10% ( $p < 0.05$ ). En estos grupos, se detectó la presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en los extractos, y la concentración de esta molécula era de aproximadamente 4.5 veces mayor que el grupo PH 35%

en comparación con el grupo TB 10%. El análisis de la morfología celular (Figura 1) demostró que en ambos grupos expuestos a los extractos que contenían componentes de los geles blanqueadores hubo reducción del número de células adheridas en la lamina de vidrio, mientras que en el grupo control las células se presentaron recubriendo todo el sustrato, en un patrón de confluencia de 100%. También se detectaron cambios morfológicos en las células que permanecían adheridas en los grupos PH 35% y TB 10% en comparación con CN, los cuales se caracterizaban por contracción en el citoplasma.



**Figura 1-** mágenes representativas del análisis de la morfología celular bajo MEB para cada grupo experimental (CN, PH 35% y TB 10%) en menor (500x) y mayor (1000x) aumento. Se puede observar que las células HaCat (setas) se presentaron en 100% de confluencia en el grupo CN, desde que las mismas recubrieron toda la superficie de la laminilla de vidrio. Ya en el grupo PH 35%, grandes áreas del substrato de vidrio pueden ser observadas (\*), demostrando intensa reducción en el número de células que permanecieron adheridas a la laminilla de vidrio, siendo que estas se presentaron alteradas en su morfología cuando comparadas con CN. En el grupo TB 10% también fueron observadas áreas del substrato de vidrio (\*) libres de células, indicando que una parte de las células se disloco de la laminilla después de la exposición a los extractos. Se observa que la mayor cantidad de células permaneció adherida en comparación con el grupo PH 35%; sin embargo, células con contracción del citoplasma celular pueden ser observadas, conforme indicado por las flechas.



## DISCUSIÓN

Las tiras de blanqueo son productos diseñados para el blanqueamiento casero, que tienen una capa fina de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> añadida a una superficie adhesiva, cuya ventaja se basa en el hecho de que no hay necesidad de utilizar bandejas para su aplicación<sup>7</sup>. Sin embargo, este sistema no ofrece ninguna protección a los tejidos gingivales y periodontales, los cuales contactan directamente con la parte adhesiva durante todo el período de blanqueo<sup>16</sup>. Según Haywood et al.<sup>23</sup>, el contacto de productos de blanqueadores con los tejidos orales puede resultar en el desarrollo de inflamación y la erosión de la encía marginal; en largos períodos de tiempo, este efecto puede resultar en la resorción cervical y la recesión gingival. De esta manera el presente estudio evaluó la citotoxicidad de una TB con 10% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sobre queratinocitos humanos in vitro.

Los resultados de esta investigación han demostrado una reducción de aproximadamente 68% en la viabilidad de las células HaCaT después de la exposición durante 1 hora a los extractos de la TB. Ya en el grupo expuesto al extracto del gel con 35% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 96.6% de reducción en la viabilidad celular fue detectada. La prueba de cuantificación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> demostró la presencia de 1.994 µg/mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en las muestras de la TB, mientras que 8.953 µg/mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se detectaron en el extracto del control positivo. Por lo tanto, la toxicidad fue proporcional a la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en los extractos. El análisis bajo MEB mostró una reducción en el número de células que permanecieron adheridas al sustrato de vidrio después de la exposición a los extractos de TB, asociados a cambios morfológicos, y siendo más intensos estos efectos en las células expuestas a los extractos de gel con 35% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Por lo tanto, se puede sugerir que la reducción en la viabilidad celular fue mediada por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, lo que resulta en la muerte celular con el consiguiente desprendimiento de células del sustrato de cultivo.

Estos datos corroboran los hallazgos descritos en el estudio realizado por Lucier et al.<sup>11</sup>, donde la evaluación de la citotoxicidad de tiras blanqueadoras con diferentes concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (6-14%) sobre un modelo de cultivo 3D de epitelio gingival. Se observó que el contacto de la cultura 3D durante 30 minutos con los productos probados, resultó en cambios en la morfología de los tejidos, asociados con la muerte celular apoptótica en las células en todos los estratos epiteliales y también condujo a un aumento de la expresión de citocinas pro-inflamatorias, estos efectos fueron proporcionales a la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en los productos blanqueadores. Otros investigadores han demostrado que los fibroblastos gingivales cultivadas en un medio que contenía 3% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> disminuyeron su capacidad proliferativa, así como la inhibición de la expresión de la fibronectina y el colágeno tipo I<sup>24,25</sup>. Se ha demostrado que el mecanismo de toxicidad de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en diferentes tipos de células es resultado de la inducción de un intenso estado de estrés oxidativo asociado con la ruptura de la membrana celular y la muerte celular por necrosis o apoptosis, aumento de la expresión génica de mediadores de la inflamación y la inhibición de la capacidad de reparación celular<sup>3, 26, 27, 28-29</sup>.

Los estudios clínicos han demostrado que la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en la saliva de los pacientes que se someten al blanqueamiento con tiras blanqueadoras (5,3% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) es de aproxima-

damente dos a cuatro veces mayor que la observada para los geles con 10% 15% de PC aplicado en bandejas individuales<sup>30,31</sup>. En un estudio realizado por Auschill et al.<sup>32</sup>, fue demostrado que el uso de un gel con 5% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aplicada en bandejas personalizadas dado lugar a irritación gingival en 20% de los pacientes, mientras que el 40% de los pacientes con TB de 5.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> informó la presencia de este efecto adverso, y en ambos grupos, el procedimiento de blanqueo era realizado dos veces al día durante 30 minutos durante un período de 14 días. Otros estudios clínicos han demostrado que el porcentaje de la sensibilidad dental y la irritación gingival es proporcional a la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en las tiras, el tiempo de contacto y el tiempo de tratamiento<sup>19, 20, 21</sup>. Según los datos obtenidos por Swift Jr. et al.<sup>18</sup>, se aproximadamente el 80% de la irritación gingival se observa después de largos períodos de tratamiento en los pacientes que utilizan tiras blanqueadoras.

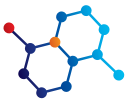
Es importante destacar que el uso de los productos de blanqueamiento sin orientación profesional se presenta como un factor de riesgo por el uso indiscriminado. Aún así, las condiciones clínicas tales como la presencia de la recesión gingival, gingivitis y enfermedad periodontal pueden influir directamente en los efectos nocivos de los productos blanqueadores sobre los tejidos orales, siendo así, la realización de tales procedimientos bajo la correcta orientación y la evaluación de un cirujano dentista es primordial para mantener la integridad y la homeostasis de los tejidos orales<sup>16</sup>. Por lo tanto, a pesar de que las TB se presentan como una modalidad de blanqueamiento eficaz asociada con bajos niveles de sensibilidad dental<sup>17, 18, 19, 20, 21</sup>, este procedimiento debe realizarse bajo supervisión profesional asociado a métodos de protección de la encía marginal, para prevenir el desarrollo de importantes cambios en los tejidos blandos de la boca.

## CONCLUSIÓN

Según los resultados de este estudio se puede concluir que el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> liberado de las tiras blanqueadoras tiene el potencial de causar un efecto citotóxico severo en los queratinocitos humanos in vitro, caracterizado por reducción en la viabilidad celular asociada a cambios en la morfología celular.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Fundación de Amparo para la Investigación del Estado de Sao Paulo (FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, procesos 2015/21770-4) y al Consejo Nacional de Investigación (CNPq – Conselho Nacional de Pesquisa, Proceso 442336/2014-4 y 303599/2014-6) por el apoyo financiero para realización de la presente investigación.



## Referencias

1. de Souza Costa CA, Hebling J, Scheffel DL, Soares DG, Basso FG, Ribeiro AP. Methods to evaluate and strategies to improve the biocompatibility of dental materials and operative techniques. *Dent Mater* 2014; (7):769-84.
2. Soares DG, Hebling J, de Souza Costa CA. Human Pulpal Responses to Peroxides. In: Perdigão J (editor). *Tooth Whitening*. 1 ed. Springer International Publishing Switzerland; 2016. p. 81-97.
3. Zhu T, Lim BS, Park HC, Son KM, Yang HC. Effects of iron-chelating agent deferroxamine on triethylene glycol dimethacrylate, 2-hydroxyethyl methacrylate, hydrogen peroxide-induced cytotoxicity. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2012; 100(1):197-205.
4. Briso ALF, Rahal V, Gallinari MO, Soares DG, de Souza Costa, CA. Complications from the Use of Peroxides. Perdigão J (editor). *Tooth Whitening*. 1 ed. Springer International Publishing Switzerland; 2016. p. 45-79.
5. Tay LY, Kose C, Herrera DR, Reis A, Loguercio AD. Long-term efficacy of in-office and at-home bleaching: a 2-year double-blind randomized clinical trial. *Am J Dent* 2012; 25(4):199-204.
6. Reis A, Kossatz S, Martins GC, Loguercio AD. Efficacy of and effect on tooth sensitivity of in-office bleaching gel concentrations: a randomized clinical trial. *Oper Dent* 2013; 38(4):386-93.
7. Hasson H, Ismail AI, Neiva G. Home-based chemically-induced whitening of teeth in adults. *Cochrane Database Syst Rev* 2006; (4):CD006202.
8. Firat E, Ercan E, Gurgan S, Yucel OO, Cakir FY, Berker E. The effect of bleaching systems on the gingiva and the levels of IL-1 $\alpha$  and IL-10 in gingival crevicular fluid. *Oper Dent* 2011; 36(6):572-80.
9. de Souza Costa CA, Riehl H, Kina JF, Sacono NT, Hebling J. Human pulp responses to in-office tooth bleaching. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2010; 109:e59-e64.
10. Cintra LT, Benetti F, da Silva Facundo AC, Ferreira LL, Gomes-Filho JE, Ervolino E, et al. The number of bleaching sessions influence pulp tissue damage in rat teeth. *J Endod* 2013; 39:1576-80.
11. Lucier RN, Etienne O, Ferreira S, Garlick JA, Kugel G, Egles C. Soft-tissue alterations following exposure to tooth-whitening agents. *J Periodontol* 2013; 84:513-19.
12. Roderjan DA, Stanislawczuk R, Hebling J, de Souza Costa CA, Soares DG, Reis A, et al. Histopathological features of dental pulp tissue from bleached mandibular incisors. *J Mater Sci Eng B* 2014; 4:178-85.
13. Roderjan DA, Stanislawczuk R, Hebling J, de Souza Costa CA, Reis A, Loguercio AD. Response of human pulps to different in-office bleaching techniques: preliminary findings. *Braz Dent J* 2015; 26:242-8.
14. Soares DG, Ribeiro APD, Sacono NT, Coldebella CR, Hebling J, de Souza Costa CA. Transenamel and transdental cytotoxicity of carbamide peroxide bleaching gels on odontoblast-like MDPC-23 cells. *Int Endod J* 2011; 44:116-25.
15. Boushell LV, Ritter AV, Garland GE, Tiwana KK, Smith LR, Broome A, et al. Nightguard vital bleaching: side effects and patient satisfaction 10 to 17 years post-treatment. *J Esthet Restor Dent* 2012; 24:211-9.
16. Briso AL, Fagundes TC, Gallinari MO, Moreira J, de Almeida L, Rahal V, et al. An in situ study of the influence of staining beverages on color alteration of bleached teeth. *Oper Dent* 2016; 41(6):627-33.
17. Demarco FF, Meireles SS, Masotti AS. Over-the-counter whitening agents: a concise review. *Braz Oral Res* 2009; 23(Suppl 1):64-70.
18. Swift EJ Jr, Heymann HO, Wilder AD Jr, Barker ML, Gerlach RW. Effects of duration of whitening strip treatment on tooth color: a randomized, placebo-controlled clinical trial. *J Dent* 2009; 37(Suppl 1):e51-e6.
19. Donly KJ, Segura A, Sasa I, Perez E, Anastasia MK, Farrell S. A controlled clinical trial to evaluate the safety and whitening efficacy of a 9.5% hydrogen peroxide high-adhesion whitening strip in a teen population. *Am J Dent* 2010; 23(5):292-6.
20. Kugel G, Gerlach RW, Aboushala A, Ferreira S, Magnuson B. Long-term use of 6.5% hydrogen peroxide bleaching strips on tetracycline stain: a clinical study. *Compend Contin Educ Dent* 2011; 32(8):50-6.
21. da Costa JB, McPharlin R, Hilton T, Ferracane JL, Wang M. Comparison of two at-home whitening products of similar peroxide concentration and different delivery methods. *Oper Dent* 2012; 37(4):333-9.
22. Soares DG, Pontes EC, Ribeiro AP, Basso FG, Hebling J, Costa CA. Low toxic effects of a whitening strip to cultured pulp cells. *Am J Dent* 2013; 26(5):283-5.
23. Haywood VB, Leonard RH, Dickinson GL. Efficacy of six months of nightguard vital bleaching of tetracycline-stained teeth. *J Esthet Dent* 1997; 9(1):13-9.
24. Tipton DA, Braxton SD, Dabbous MK. Role of saliva and salivary components as modulators of bleaching agent toxicity to human gingival fibroblasts in vitro. *J Periodontol* 1995; 66(9):766-74.
25. Oda D, Nguyen MP, Royack GA, Tong DC. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oxidative damage in cultured oral epithelial cells: the effect of short-term vitamin C exposure. *Anticancer Res* 2001; 21(4A):2719-24.
26. Lee YH, Kang YM, Heo MJ, Kim GE, Bhattarai G, Lee NH, et al. The survival role of peroxisome proliferator-activated receptor gamma induces odontoblast differentiation against oxidative stress in human dental pulp cells. *J Endod* 2013; 39(2):236-41.
27. Soares DG, Basso FG, Hebling J, de Souza Costa CA. Concentrations of and application protocols for hydrogen peroxide bleaching gels: effects on pulp cell viability and whitening efficacy. *J Dent* 2014; 42(2):185-98.
28. Soares DG, Basso FG, Scheffel DS, Hebling J, de Souza Costa CA. Responses of human dental pulp cells after application of a low-concentration bleaching gel to enamel. *Arch Oral Biol* 2015; 60(9):1428-36.
29. Soares DG, Gonçalves Basso F, Hebling J, de Souza Costa CA. Effect of hydrogen-peroxide-mediated oxidative stress on human dental pulp cells. *J Dent* 2015; 43(6):750-6.
30. Hannig C, Zech R, Henze E, Dorr-Tolui R, Attin T. Determination of peroxides in saliva-kinetics of peroxide release into saliva during home-bleaching with Whitestrips and Vivastyle. *Arch Oral Biol* 48(8):559-66.
31. Hannig C, Zech R, Henze E, Dreier S, Attin T. Peroxide release into saliva from five different home bleaching systems in vivo. *Am J Dent* 2005; 18(1):13-8.
32. Auschill TM, Schneider-Del Savio T, Hellwig E, Arweiler NB. Randomized clinical trial of the efficacy, tolerability, and long-term color stability of two bleaching techniques: 18-month follow-up. *Quintessence Int* 2012; 43(8):683-94.