

**EFEITO DO CLAREAMENTO COM PERÓXIDO DE  
HIDROGÊNIO EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES NO  
ESTRESSE OXIDATIVO GENGIVAL: UM ESTUDO CLÍNICO  
RANDOMIZADO**

Valderlane Lopes Pinheiro Colares

São Luis

2018

Valderlane Lopes Pinheiro Colares

**EFEITO DO CLAREAMENTO COM PERÓXIDO DE  
HIDROGÊNIO EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES NO  
ESTRESSE OXIDATIVO GENGIVAL: UM ESTUDO CLÍNICO  
RANDOMIZADO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-  
Graduação em Odontologia da Universidade  
CEUMA para obtenção do título de Mestre em  
Odontologia.

Área de concentração: Odontologia Integrada.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Elizabeth Soares  
Fernandes

Co-orientador: Prof<sup>º</sup> Dr. Eduardo Buozi Moffa

São Luis

2018

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (UNICEUMA) Universidade Ceuma  
Processamento técnico Catalogação na fonte elaborada pela equipe de Bibliotecárias:**

Gleice Melo da Silva – CRB 13/650  
Luciane de Jesus Silva e Silva Cabral – CRB 13/629  
Michele Alves da Silva – CRB 13/601  
Verônica de Sousa Santos Alves – CRB 13/621

C683e Colares, Valderlene Lopes Pinheiro.

Efeito do clareamento com peróxido de hidrogênio em diferentes concentrações no estresse oxidativo gengival : um estudo clínico randomizado./ Valderlene Lopes Pinheiro Colares– São Luís:UNICEUMA, 2018.  
99 f. ;30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Curso de Odontologia Integrada – Universidade CEUMA, 2018.

1. Clareamento dental. 2.Fluido gengival.3.Estresse oxidativo.I.FERNANDES, Elizabeth Soares.(Orientadora) II. BANDÉCA, Matheus Coelho. (Coordenador)III. Título.

CDU:616.314-089.818.1

Proibida a reprodução total ou parcial, de qualquer forma ou por qualquer meio eletrônico ou mecânico, inclusive através de processos xerográficos, sem permissão expressa do Autor.(Artigo 184 do Código Penal Brasileiro, com a nova redação dada pela Lei n.8.635, de 16-03-1993).

Nome: Valderlane Lopes Pinheiro Colares

Título: Efeito do clareamento com peróxido de hidrogênio em diferentes concentrações no estresse oxidativo gengival: um estudo clínico randomizado.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade CEUMA para obtenção do título de Mestre.

Aprovado em: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

Banca Examinadora

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Elizabeth Soares Fernandes

Universidade CEUMA

---

Prof. Dr. Eduardo Buozi Moffa

Universidade CEUMA

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Luciana Salles Branco de Almeida

UFMA

## DEDICATÓRIA

Ao meu pai Valter Pinheiro (*in memoria*) pela educação e por ter me proporcionado o que podia de melhor enquanto viveu. À minha mãe Ana Lopes, pelo amor incondicional, irmãos Lana, Lena e Valmirlan, e avó Francisca Marina, pelo apoio, amor e companheirismo, pois a família é a base de tudo e reflexo de quem nos tornamos.

Ao meu querido e amável esposo Samuel Colares, pelo empenho e carinho com que sempre me impulsionou a enfrentar e correr atrás dos meus sonhos, você sabe que foi e é instrumento nas mãos de Deus usado para que tudo isso fosse possível. Obrigada pela compreensão e paciência em minhas ausências, por ter enfrentado ao meu lado os momentos fáceis e difíceis, sempre com bom ânimo apresentando soluções para os problemas que surgiam, por ter aberto mão das suas próprias vontades para que eu pudesse alcançar essa benção que é nossa, dentre tantas provas de amor essa foi a mais linda que você poderia me dar, te amo para sempre, muito obrigada por não desistir de mim e por acreditar no meu potencial mesmo quando eu não acreditei.

À minha filha Sophie, razão da minha vida e dos meus esforços constantes em busca do melhor. Minha pequenininha que mesmo sem entender o motivo da minha ausência e correria, persistia em estar ao meu lado. Obrigada pelo lindo sorriso cada vez que eu chegava em casa, mesmo sem saber você regarregava minhas forças para que eu pudesse enfrentar o dia seguinte. Por ter completado a minha vida e fazer dos meus dias os mais felizes.

**Amo vocês...**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter me permitido alcançar essa vitória, possibilitando que eu tivesse cada vez mais certeza de que a Sua vontade é perfeita e agradável.

À minha querida orientadora, Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Elizabeth Fernandes, muitíssimo obrigada por toda paciência, dedicação, ensinamentos e confiança em mim depositados, pelo privilégio sua de sua amizade, oportunidades oferecidas e disponibilidade sempre. Obrigada pela compreensão durante todo o trabalho, serei grata eternamente.

Ao Prof. Dr. Matheus Coelho Bandeca por toda compreensão, disponibilidade e apoio durante todo curso, enquanto representante do Programa de Pós-Graduação em Odontologia Integrada da Universidade Ceuma.

À Universidade Ceuma, representada pelo Prof Dr. Valério Monteiro.

Aos professores do programa de Pós-graduação da Universidade Ceuma: Leticia Machado, Ceci Carvalho, Etevaldo Matos, Marco Aurélio Paschol, Meire Coelho, Rudys de Jesus pelo aprendizado, amizade, disponibilidade e trocas de conhecimentos durante todo o curso.

Ao Prof Dr. Eduardo Moffa, pelo apoio, dedicação, orientação e incentivo, obrigada por fazer parte do nosso trabalho.

Aos meus queridos amigos e companheiros de Pós-Graduação: Alessandra Trandafilov, Ana Júlia, Ana Carla, Roberta, Cláudia Fahd, Fábio Costa, Nayre Lauande, Patrícia Serra e Sílvia Albertin muito obrigada pelo convívio, companheirismo e amizade, sou grata pela oportunidade de tê-los conhecido.

À querida colega Suellen, pela enorme colaboração, ajuda, esclarecimentos e disponibilidade sempre que precisei, você foi indispensável para a realização deste trabalho, meu sincero agradecimento e admiração.

À professora Dr<sup>a</sup> Andrezza Maciel, minha querida amiga, comadre e eterna mestre, sem o seu incentivo eu jamais teria alcançado esta conquista.

Aos amigos que a farmacologia me concedeu Domingos Magno, Nágila Fialho, Saulo Figueiredo, João Francisco, pelo apoio, ajuda e esclarecimentos.

Aos professores Marcelo Muscará (USP) e Simone Teixeira (USP), Walter Luiz Siqueira que mesmo estando longe contribuíram de forma ímpar para este trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa (FAPEMA) pelo auxílio financeiro.

# **RESUMO**



Colares VLP. Efeito do clareamento com peróxido de hidrogênio em diferentes concentrações no estresse oxidativo gengival: um estudo clínico randomizado [dissertação]. São Luís. Universidade CEUMA; 2018.

## **RESUMO**

**Objetivo:** O presente trabalho determinou os efeitos do clareamento dental com peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) em diferentes concentrações (15 e 35%), na geração de estresse oxidativo através da quantificação de marcadores no fluido crevicular de pacientes expostos ao agente clareador.

**Materiais e Métodos:** Foi realizado um ensaio clínico randomizado, duplo-cego, de boca dividida, com 25 pacientes, que tiveram sua arcada dentária dividida aleatoriamente para aplicação das duas concentrações de  $H_2O_2$  (15 e 35%). O fluido crevicular foi coletado em diferentes tempos (antes e após o clareamento) e analisado em ensaios de marcadores do estresse oxidativo e análise de proteômica. A análise estatística dos dados foi realizada por análise de variância (ANOVA) de medidas repetidas, seguida por Bonferroni. Para todos os testes,  $p < 0,05$  foi considerado como significativo.

**Resultados:** Ambos agentes clareadores apresentaram efetividade semelhantes no clareamento dental, sendo o clareamento mais efetivo 21 dias após a 1ª sessão. A análise de marcadores de estresse oxidativo no fluido crevicular demonstrou a ocorrência da diminuição das concentrações de óxido nítrico e  $H_2O_2$  em amostras coletadas de pacientes submetidos à clareamento com  $H_2O_2$  35%, 1-7 dias após a 1ª sessão. Observou-se ainda, que estes níveis são restaurados à concentrações equivalentes à detectadas em condições basais (pré-clareamento), logo após a 2ª exposição ao agente

clareador. Quando aplicado à 15%, o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> não causou alterações nos níveis creviculares de NO e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Por outro lado, ambos agentes clareadores promoveram migração de neutrófilos (indicado pelo aumento da atividade da enzima mieloperoxidase) para o fluido crevicular, indicando a ocorrência de um processo inflamatório pós-clareamento que se estendeu por todo o período de avaliação. Conclusão: O clareamento com agentes a base de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> causa inflamação independente da concentração utilizada. Sistemas clareadores à base de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 35% podem resultar em um quadro inflamatório mais prolongado. Ambas as concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> demonstraram eficácia semelhante, sugere-se que o uso de concentrações mais baixas, resultariam em menores danos teciduais no paciente.

**Palavras-chave:** Clareamento dental; fluido gengival crevicular; estresse oxidativo.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Análise bioquímica de marcadores em amostras de FGC.....	55
Figura 2 – Gráficos de Venn com proteínas em amostras de FGC H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 15% .....	56
Figura 3 – Gráficos de Venn com proteínas em amostras de FGC H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 35% .....	57

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Efetividade do clareamento dental com de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 15 e 35% .....	42
Tabela 2 – Abundância de proteínas em amostras de FGC obtidas de pacientes submetidos à clareamento dental com H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (15-35%) .....	43
Tabela 3 – Identificação de proteínas em amostras de FGC obtidas de pacientes submetidos à clareamento dental com H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 15% .....	44
Tabela 4 – Identificação de proteínas em amostras de FGC obtidas de pacientes submetidos à clareamento dental com H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 35% .....	49

## LISTA DE ABREVIATURAS

H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogênio
PC	Peróxido de carbamida
FGC	Fluido gengival crevicular
NO	Óxido nítrico
O <sub>2</sub>	Oxigênio
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Ânion superóxido
SOD	Superóxido dismutase
ONOO <sup>-</sup>	Peroxinitrito
MPO	Mieloperoxidase
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	17
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	19
<b>3. RESULTADOS</b> .....	26
<b>4. DISCUSSÃO</b> .....	30
<b>5. CONCLUSÃO</b> .....	36
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	37
<b>APÊNDICE</b> .....	58
APÊNDICE 1 .....	59
APÊNDICE 2 .....	62
<b>ANEXO</b> .....	63
ANEXO A.....	64

## **Envolvimento do estresse oxidativo e nitrosativo na resposta crevicular ao clareamento dental à base de peróxido de hidrogênio: um estudo clínico randomizado**

\*artigo a ser submetido à revista Scientific Reports

### **RESUMO**

Objetivo: O presente trabalho determinou os efeitos do clareamento dental com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em diferentes concentrações (15 e 35%), na geração de estresse oxidativo e/ou nitrosativo através da quantificação de marcadores no fluido crevicular de pacientes expostos ao procedimento. Materiais e Métodos: Foi realizado um ensaio clínico randomizado, duplo-cego, de boca dividida, com 25 pacientes, que tiveram sua arcada dentária dividida aleatoriamente para aplicação das duas concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (15 e 35%). A coleta de fluido crevicular foi realizada em diferentes tempos (antes e após o clareamento). A análise estatística dos dados foi realizada por análise de variância (ANOVA) de medidas repetidas, seguida por Bonferroni. Para todos os testes,  $p \leq 0,05$  foi considerado como significante. Resultados: A efetividade dos agentes clareadores foi avaliada onde foi possível observar que o clareamento dental com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> é efetivo independente da concentração utilizada. A concentração de 35% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> alterou a liberação de NO nos níveis creviculares. Os níveis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> também foram quantificados onde no FGC onde não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos. Os níveis de atividade da MPO encontraram-se aumentados quando comparados a amostras controle, independente do tempo. Estas alterações foram acompanhadas por alterações no perfil proteômico. Conclusão: O clareamento com agentes a base de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> causa inflamação

independente da concentração utilizada. Sistemas clareadores à base de  $H_2O_2$  35% podem resultar em um quadro inflamatório mais prolongado. Considerando a eficácia de ambas as concentrações de  $H_2O_2$  no clareamento dental, sugere-se que o uso de concentrações mais baixas, resultariam em menores danos teciduais no paciente.

**Palavras-chave:** Clareamento dental; fluido gengival crevicular; estresse oxidativo.



## INTRODUÇÃO

O clareamento dental é um dos tratamentos estéticos mais solicitados nos consultórios odontológicos, uma vez que dentes brancos, bem contornados e corretamente alinhados apresentam-se como padrão de sorriso ideal<sup>1</sup>. As técnicas de clareamento dental empregam diferentes agentes clareadores em diferentes concentrações, os quais podem ser aplicados sobre a estrutura dental de diversas formas e tempos distintos<sup>2,3</sup>. Os agentes clareadores utilizados comumente pelos profissionais são o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ )<sup>4</sup> ou peróxido de carbamida (PC) em concentrações que variam de 10 a 38%<sup>5</sup>.

Embora um alto sucesso clínico seja observado com este procedimento<sup>6</sup>, alguns efeitos adversos como sensibilidade dental<sup>7,8,9</sup> alterações nos tecidos moles<sup>10,11</sup>, efeito genotóxico<sup>12</sup> em bactérias e células<sup>13</sup>, danos à polpa<sup>14,15,16</sup>, efeito citotóxico<sup>17,18,19</sup>, além de irritação gengival<sup>3,20</sup> têm sido relatados com agentes clareadores. Ainda, possíveis efeitos pró-inflamatórios desses agentes clareadores têm sido estudados, embora as evidências acumuladas sejam controversas<sup>17,21,22,23,24</sup>.

O clareamento dental realizado no consultório freqüentemente emprega agentes à base de  $H_2O_2$ <sup>25</sup>. Estudos demonstram que quanto maior a concentração deste agente clareador, maior sua eficácia, uma vez que a existência de mais moléculas reativas do produto leva à maior formação de radicais livres e reações oxidativas, facilitando assim, a remoção de pigmentação dos dentes<sup>14,18,19</sup>. Por outro lado, é possível que a formação destes radicais livres possa impactar as respostas de estresse oxidativo e

nitrosativo do paciente, uma vez que o  $H_2O_2$  é uma das principais moléculas geradas nestas resposta<sup>26</sup>.

Embora não existam relatos de que o clareamento dental promova estresse oxidativo e nitrosativo no tecido gengival e/ou outras estruturas dentais, estudos sugerem que esta técnica pode ocasionar um processo inflamatório nestes tecidos<sup>21,22,23</sup>. A resposta inflamatória constitui o mecanismo principal de defesa do corpo frente a uma agressão, e tem a função de proteger o organismo. É caracterizada pela migração de células de defesa para o tecido afetado, onde os leucócitos como neutrófilos e macrófagos são de fundamental importância nesse processo, uma vez que participam do processo inflamatório e iniciam e mantêm respostas imunes, que podem resultar em alterações teciduais deletérias ou regenerativas<sup>27,28</sup>, levando ou à ruptura ou à recuperação tecidual.

Dentre estas alterações, destaca-se o papel do estresse oxidativo. Este, é caracterizado por um desequilíbrio entre a geração excessiva de compostos oxidantes frente a uma produção insuficiente de mecanismos antioxidantes de defesa<sup>26,29</sup>, resultando assim, em dano tecidual. Neste processo, ocorre a produção exacerbada de espécies reativas de oxigênio (EROs), como  $H_2O_2$ , ânion superóxido ( $O_2^-$ ) e radicais hidroxila ( $HO^-$ ) composto este, extremamente reativo e deletério<sup>30,31</sup>. Ainda, a produção de óxido nítrico (NO) ocorre em paralelo como parte do estresse nitrosativo, pela ação da enzima óxido nítrico sintase, decorrente da união da arginina com  $O_2$ <sup>30</sup>. Uma vez formado, o NO pode reagir com o  $HO^-$  e originar peroxinitrito ( $ONOO^-$ ), que por sua vez causa dano tecidual, uma vez que promove alterações no DNA e proteínas celulares, ocasionando apoptose destas

células e muitas vezes, a perda de função tecidual<sup>14,31,32,33</sup>. Além disso, o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> liberado pode reagir com a mieloperoxidase (MPO), uma enzima expressa em grandes quantidades em neutrófilos e utilizada como marcador de influxo destas células para tecidos inflamados<sup>34,35,36</sup>. A ativação da MPO pode levar à produção de outro potente radical oxidante, o ácido hipocloroso (HOCl) à partir de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, amplificando assim, a formação de EROs por neutrófilos<sup>37</sup>.

Considerando estas evidências, é possível que o clareamento à base de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> promova estresse oxidativo e nitrosativo após sua aplicação. Assim, este estudo teve como objetivo, determinar os efeitos do clareamento dental com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em diferentes concentrações, na geração de estresse oxidativo e nitrosativo, bem como suas consequências à nível de fluido crevicular em pacientes submetidos a este processo estético.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### **Pacientes**

O presente estudo clínico foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade CEUMA (número do parecer é 1.307.220). A pesquisa foi registrada no Registro Brasileiro de Ensaio Clínicos (Rebec) sob número RBR-4kkcd7. Após a aprovação, foram selecionados 25 voluntários (18-40 anos de idade) com boa saúde geral e bucal. Ainda, os voluntários apresentavam dentes ântero-superiores com cor A3 ou mais escura, com vitalidade pulpar e livres de doença periodontal, restaurações e lesões cariosas. Foram excluídos do estudo pacientes com má higiene bucal;

gestantes e lactantes; pacientes que realizaram clareamento dental previamente; fumantes, indivíduos com restaurações, tratamento endodôntico ou prótese dental nos dentes ântero-superiores. Pacientes com trincas, retrações gengivais; lesões cervicais não cariosas; fraturas; sensibilidade dental espontânea; descoloração interna severa, aqueles que apresentaram bruxismo ou que fizessem uso de aparelho ortodôntico fixo, e pacientes que fizeram uso de medicamentos analgésicos e/ou anti-inflamatórios até 2 semanas antes do início do clareamento ou durante o procedimento. Todos os voluntários assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e receberam profilaxia dental com pasta profilática e escova de Robson uma semana antes do início do clareamento.

### **Grupos experimentais**

O estudo foi um ensaio clínico randomizado, duplo-cego, de boca dividida, no qual a população amostral foi de 25 pacientes, onde todos os pacientes selecionados tiveram sua arcada dentária dividida aleatoriamente para aplicação das duas concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (15 e 35%).

### **Procedimento clareador**

Após profilaxia, foi realizada a aferição basal de cor dos seis dentes ântero-superiores por comparação com a escala de cor Vita Classic e Vita Bleachedguide, e espectrofotometria com Vita Easyshade Advance 4.0 (Vident, Brea, CA, EUA). A efetividade do procedimento foi acompanhada por estas três ferramentas, 7 e 21 dias após a 1ª sessão de aplicação do clareamento dental.

Para aplicação do agente clareador, uma barreira gengival de resina fotopolimerizável (Top Dam, FGM) de 2 mm de espessura foi confeccionada dos dentes 15 ao 25. A barreira foi aplicada também na linha média, separando a hemi-arcada direita da esquerda, a fim de evitar contaminação cruzada entre os agentes clareadores aplicados. Os géis clareadores rotulados em A e B, foram aplicados aleatoriamente em cada hemi-arcada, na superfície vestibular dos dentes, de forma uniforme por um único operador.

Os materiais clareadores foram preparados conforme orientação do fabricante. Os géis Lase Peroxide Sensy 35% e Lase Peroxide Lite 15% foram aplicados em duas sessões (três aplicações de 15 min por sessão), sem utilização de luz e com intervalo de 7 dias entre as mesmas. A remoção dos géis clareadores foi realizada com cânula de sucção e água. Todos os pacientes foram instruídos a realizar a escovação regular dos dentes, com creme dental sem agente clareador em sua composição<sup>48</sup>.

### **Coleta do fluido gengival crevicular**

Para análise de vias associadas ao estresse oxidativo e nitrosativo, coletou-se o fluido gengival crevicular (FGC). Para isto, os tecidos moles foram secos, protegidos com afastador gengival ArcFlex, isolados com roletes de algodão e os dentes foram levemente secos com jatos de ar.

O FGC foi coletado dos dentes 11 e 21, em tiras de papel padrão (Periopaper, IDE Interstate, Amityville, NY, EUA). Para isto, as tiras foram inseridas em cada sulco gengival com profundidade de 1-2 mm e o FGC foi

coletado por 15 segundos. De cada dente, foram coletadas 2 tiras de FGC. Após a coleta, as tiras contendo FGC foram imediatamente armazenadas em tubos estéreis em freezer a  $-86^{\circ}\text{C}$  para posterior análise dos níveis de óxido nítrico, peróxido de hidrogênio e mieloperoxidase. Tiras contaminadas com sangue foram excluídas da coleta. A coleta foi realizada antes, 1, 7, 8 e 21 dias após o início do procedimento clareador. Para aumentar a confiabilidade, todas as aferições clínicas e coletas de FGC foram realizadas pelo mesmo examinador.

## **Dosagens bioquímicas em amostras de FGC**

### **Processamento das amostras**

Tiras contendo FGC (1 de cada dente) foram incubadas individualmente com 160  $\mu\text{l}$  de tampão fosfato-salina (PBS) por 10 min, sendo vortexadas a cada 2 min de incubação. Em seguida, as amostras foram centrifugadas à 3.000 rpm, por 5 min. O sobrenadante resultante foi então coletado e utilizado para análise dos níveis de NO,  $\text{H}_2\text{O}_2$  e atividade da MPO.

### **Quantificação de $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$**

O conteúdo de  $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$  em amostras de FGC foi mensurado pelo ensaio de Griess conforme metodologia descrita previamente<sup>38</sup>. O  $\text{NO}_3^-$  foi reduzido à nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) por incubação de 80  $\mu\text{l}$  da amostra com 20  $\mu\text{l}$  de nitrato redutase (1UI/ml) e 10  $\mu\text{l}$  de NADPH (1 mM) por 30 min, à  $37^{\circ}\text{C}$  em placa de 96 poços. Após incubação, 100  $\mu\text{l}$  de reagente de Griess (5% v/v  $\text{H}_3\text{PO}_4$  contendo 1% de sulfanilamida e 0,1% de dihidrocloreto de naftileno) foram

adicionados por poço, e a reação foi incubada por 30 min à 37°C. As absorvâncias foram então, imediatamente lidas em 550 nm através de espectrofotometria (MB-580/Heales). As absorvâncias obtidas foram comparadas à de uma curva padrão de nitrito (0-600 µM) e os resultados foram expressos como NO<sup>x</sup> em µM.

### **Níveis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**

A produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi mensurada em amostras de FGC usando o kit de ensaio H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/ peroxidase, de acordo com as instruções do fabricante (Sigma-Aldrich). Para isto, 50 µl de amostra foram incubados com 46 µl de tampão de ensaio, 2 µl de substrato fluorescente de peroxidase e 2 µl de substrato de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Em seguida, a placa foi incubada à 37°C no escuro, e a absorvância foi lida em 570 nm, em diferentes tempos: 3 min (absorvância inicial) e a cada 10 min até uma das amostras apresentar absorvância similar ao maior ponto da curva padrão. As absorvâncias obtidas foram comparadas às de uma curva padrão de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0-40 µM). Os resultados foram como níveis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em µM.

### **Atividade da MPO**

A medida da atividade da MPO baseou-se na velocidade de oxidação do substrato *o*-dianisidina na presença de água oxigenada, evidenciada pela coloração<sup>39</sup>. As amostras de FGC (25 µl) foram adicionadas de igual volume de solução de fosfato de potássio (pH 6,0) contendo 0,5% de brometo de hexadeciltrimetilamônia (HTAB, Sigma Chem. Co, EUA). Em seguida, as amostras foram sonicadas por 20 segundos e aquecidas por 2 h à 60°C para

inativação da catalase endógena (Ohta, Kongo e Kishikawa, 2003). Após incubação, as amostras foram centrifugadas à 10.000 g por 5 minutos. Uma alíquota de 10 µl do sobrenadante resultante foi incubada com 200 µl de solução de fosfato de potássio (5 mM, pH 6) contendo 16,7 mg/mL de *o*-dianisidina (Sigma Chem. Co., EUA) e 0,0005% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por poço, em microplaca. A monitorização da velocidade de formação do produto de oxidação da *o*-dianisidina foi realizada registrando-se o aumento da absorbância da mistura a 460 nm (leituras coletadas em intervalos de 10 segundos durante 10 minutos). A atividade de MPO foi calculada a partir da velocidade máxima da reação por segundo e o resultado foi expresso em porcentagem (%) da velocidade da reação em relação à absorbância inicial, como indicativo do acúmulo de neutrófilos.

## **Identificação de proteínas do FGC por espectrometria de massas**

### **Preparo das amostras**

Para identificação das proteínas presentes, foi preparado um *pool* de tiras por tempo experimental de cada agente clareador, resultando em 6 *pools*, os quais foram incubados com 150 µl de uma solução contendo 80% acetonitrila, 19,9% água destilada e 0,1% ácido trifluoroacético e sonicados 3 vezes, por 1 min para remoção de todas as proteínas contidas nas tiras de papel. Em seguida, as amostras foram liofilizadas e ressuspensas em 1000 µl de água destilada. A concentração de proteína total contendo em cada *pool* foi avaliada pela técnica do ácido bicinonínico (Micro BCATM). Aliquotas contendo quantidades iguais de proteína (10 µg/*pool*) foram liofilizadas e



então, desnaturadas e reduzidas através da adição de 200 µl de tampão 1 (pH 7,8; contendo 4 M ureia, 10 mM de ditioneitol (DTT), 50 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ). Após 2 h de incubação, 1000 µl de tampão 2 (pH=7,8; 50 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ) foram adicionados a cada *pool*, e a digestão das proteínas foi realizada durante 18 h à 37°C, por adição de 2% (w/w) de tripsina (Promega, Madison, WI, EUA). Em seguida, as amostras foram secas em SpeedVac, dessalinizadas através de ZipTip® para remoção de resíduos de tampão, e liofilizadas novamente.

### **Cromatografia líquida tandem espectrometria de massas**

A identificação de proteínas foi realizada por separação dos peptídeos, e as análises espectrométricas foram feitas utilizando-se nano-HPLC Proxeon (Thermo Scientific, Sao Jose, CA, EUA), o qual permite cromatografia líquida in-line com coluna capilar. A coluna utilizada foi de 75 mm x 610 mm (Pico Tip™ EMITTER, New Objective, Woburn, MA) preenchida com resina C18 com poros de 5 µm de diâmetro e 200Å (Michrom BioResources, Auburn, CA), acoplado a espectrômetro de massas (LTQ-Velos, Thermo Scientific, Sao Jose, CA, EUA). Realizou-se ionização por *electrospray* em modo de busca, na faixa de valores m/z 390-2000 em tandem MS/MS. Para isto, quantidades iguais de amostras liofilizadas foram ressuspensas em 20 µl de ácido fórmico 1% e então submetidas a nLC-ESI-MS/MS. O HPLC de fase reversa nanoflow foi desenvolvido com um gradiente linear de 85 min variando de 0 a 100% de solvente (0,1% ácido fórmico em acetonitrila), num fluxo de 200 nl/min, com pressão máxima de 280 bar. A voltagem e temperatura do capilar de transferência de íons

utilizadas foram 1,8 kV e 250°C, respectivamente. Cada espectro (MS) obtido foi analisado por seleção sequencial automatizada de sete peptídeos para CID, com exclusão dinâmica dos íons previamente selecionados. Os dados de MS/MS foram confrontados com o banco de dados de proteínas humanas (UniProt and TrEMBL, Swiss Institute of Bioinformatics, Geneva, Switzerland, <http://ca.expasy.org/sprot>) usando o algoritmo SEQUEST no software Proteome Discoverer 1.3 (Thermo Scientific, San Jose, CA, USA). Os filtros utilizados no SEQUEST como critério aplicado aos espectros MS/MS foram: 1.5; 2.5; 3.1; 3.1; 4.5 para o Xcorr aplicado em adição ao filtro Percolator. Os resultados das buscas foram filtrados com uma taxa de falsas descobertas de 1% utilizando uma estratégia de pesquisa de banco de dados inversa.

### **Análise Estatística**

Os dados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). A análise estatística dos dados foi realizada por análise de variância (ANOVA) de medidas repetidas, seguida por Bonferroni. Para todos os testes,  $p \leq 0,05$  foi considerado como significativo.

## **RESULTADOS**

### **O clareamento dental com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> é efetivo independente da concentração utilizada**

A tabela 1 demonstra a efetividade dos agentes clareadores utilizados, à partir de 7 dias após a 1ª sessão em comparação com medidas basais dos pacientes. A efetividade dos agentes clareadores foi semelhante, com a

maior efetividade observada 21 dias após a 1ª sessão, para ambas as concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> quando avaliada por Vita Bleachedguide. Não foram observadas diferenças entre os agentes clareadores ao longo do tempo, através das aferições por Vita Classic e Vita Easyshade, embora a efetividade de ambos tenha sido observada nas duas técnicas.

### **Migração de neutrófilos e níveis alterados de NO e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> são detectados em amostras de FGC após o clareamento com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**

Os níveis creviculares dos marcadores de estresse oxidativo e nitrosativo, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e NO, foram analisados em amostras coletadas de diferentes tempos experimentais. A figura 1A demonstra os níveis de NO em amostras de FGC obtidas antes e após o clareamento dental com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (15-35%). Observou-se que enquanto o clareamento com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 15% não altera a produção de NO, a aplicação de concentração elevada de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (35%) causa redução (~31%) deste mediador, tão logo quanto 1 dia após a 1ª sessão, permanecendo elevado por 7 dias. Após a 2ª sessão de clareamento, os níveis de NO retornaram a níveis semelhantes aos observados em condições basais.

Os níveis creviculares de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> também foram quantificados em amostras de FGC coletadas antes e 7 e 21 dias após o clareamento. Embora não tenham sido observadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos, pacientes que receberam clareamento a 15% e 35% apresentaram redução dos níveis creviculares de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (21% e 33%, respectivamente) 7 dias após a 1ª sessão, tendo estes níveis retornado aos basais ao final dos 21 dias de avaliação (figura 1B).

Ainda, observou-se aumento da velocidade de liberação de MPO (indicativo de acúmulo de neutrófilos) em amostras de FGC de pacientes submetidos ao clareamento com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 15 e 35%. Os níveis de atividade da MPO encontraram-se aumentados (22 vezes) quando comparados a amostras controle, independente do tempo pós-clareamento ou da concentração do agente clareador utilizada (figura 1C).

### **Análise proteômica do FGC antes e após-clareamento dental com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**

Foram detectadas 257 proteínas em amostras pré-clareamento obtidas de pacientes expostos a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 15%. Após o clareamento, observou-se uma redução desta quantidade de proteínas, tendo as amostras coletadas 7 dias após a 1<sup>a</sup> sessão apresentado 222 proteínas (redução de 13,6%) e 21 dias após, 154 proteínas (redução de 40,1%). Dentre as proteínas detectadas (Tabela 3), foi observado um aumento progressivo na quantidade de proteínas relacionadas à síntese de NO (de 0% em condições basais para 1,3% em 21 dias após a 1<sup>a</sup> sessão de clareamento), estresse oxidativo (de 3,9% em condições basais para 5,8% em 21 dias após a 1<sup>a</sup> sessão de clareamento), regulação de neutrófilos (de 2,3% em condições basais para 6,5% em 21 dias após a 1<sup>a</sup> sessão de clareamento) e sobrevivência celular (de 9,7% em condições basais para 11,7% em 21 dias após a 1<sup>a</sup> sessão de clareamento) (Tabela 2).

Por outro lado, as mesmas amostras apresentaram um aumento transitório de proteínas relacionadas à danos em ácidos nucleicos (de 3,9% em condições basais para 4,5%) 7 dias após a 1<sup>a</sup> sessão de clareamento, tendo o número destas proteínas reduzido para 2,6% ao final do período de observação (21

dias após a 1ª sessão) (Tabela 2). Da mesma forma, houve redução transitória no número de proteínas associadas à regeneração tecidual, sendo registrado um quantitativo de 5,1% em condições pré-clareamento, 2,3% e 6,5%, 7 e 21 dias após a 1ª sessão, respectivamente (Tabela 2).

Avaliou-se também, as proteínas creviculares de pacientes submetidos a clareamento dental com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 35%. Foram detectadas 353 proteínas creviculares nestes pacientes em condições pré-clareamento. Como observado em pacientes expostos ao agente clareador 15%, após clareamento dental com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 35%, houve redução desta quantidade de proteínas, tendo as amostras coletadas 7 dias após a 1ª sessão apresentado 255 proteínas (redução de 27,8%) e 21 dias após, 225 proteínas (redução de 36,3%). Dentre as proteínas detectadas (Tabela 4), notou-se um aumento progressivo na quantidade de proteínas relacionadas ao estresse oxidativo (de 1,7% em condições basais para 2,7% em 21 dias após a 1ª sessão de clareamento). O número de proteínas associadas à regulação de neutrófilos manteve-se estável 7 dias após a 1ª sessão, decaindo após os 21 dias de observação (de 2,6% em condições basais para 1,3% em 21 dias após a 1ª sessão de clareamento). O mesmo foi notado para proteínas envolvidas na regeneração tecidual (de 5,4% em condições basais para 3,6% em 21 dias após a 1ª sessão de clareamento) (Tabela 2).

Entretanto, as mesmas amostras apresentaram um aumento transitório de proteínas relacionadas à danos em ácidos nucléicos (de 2,0% em condições basais para 3,1%) 7 dias após a 1ª sessão de clareamento, tendo o número destas proteínas reduzido para 2,2% ao final do período de observação (21 dias após a 1ª sessão) (Tabela 2). Da mesma forma, houve redução

transitória no número de proteínas associadas à produção de NO, sendo registrado um quantitativo de 0,3% em condições pré-clareamento, 0% e 0,4%, 7 e 21 dias após a 1ª sessão, respectivamente (Tabela 2). Proteínas associadas à sobrevivência celular mantiveram-se estáveis desde o basal até o término de avaliação pós-clareamento (21 dias), variando de 8,5-8,9% (Tabela 2).

Dentre as classes de proteínas estudadas, algumas delas atua em mais de uma via, como pode ser observado através das tabelas 3 e 4. Ainda, através dos diagramas de Venn (figuras 2 e 3), pode-se observar a dinâmica de alteração das proteínas ao longo do período observado, uma vez que algumas grupos específicos de proteínas participam de uma determinada resposta em tempos específicos.

## **DISCUSSÃO**

Evidências indicam que diferentes concentrações de géis clareadores contendo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> proporcionaram a mesma eficácia no clareamento dental<sup>5</sup>. No presente estudo, confirmou-se a efetividade de agente clareadores à base de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Ambas as concentrações avaliadas foram efetivas através da análise Vita Bleachedguide, Vita Classic e Vita Easyshade, embora diferenças ao longo do tempo tenham sido detectadas somente através de Vita Bleachedguide, com efetividade melhor evidenciada para os agentes clareadores 21 dias após a 1ª sessão.

Apesar de efetivos, existe controvérsia acerca da segurança de utilização de agentes clareadores à base de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, uma vez que alguns estudos sugerem a existência de efeitos deletérios decorrentes da aplicação dos mesmos. Estes

efeitos deletérios incluem sensibilidade dental<sup>7,8,9</sup>, efeitos citotóxicos e genotóxicos<sup>12</sup>, danos na polpa e irritação gengival<sup>3,20</sup>, dentre outros. Evidências ainda atribuem efeitos pró- inflamatórios aos agentes clareadores deste tipo, principalmente a nível de polpa dental<sup>14,15,16</sup>. Ainda, estudos sugerem que estes efeitos são concentração-dependente<sup>35,40</sup>. Entretanto, não existem relatos de que o clareamento dental causa estresse oxidativo e/ou nitrosativo nos tecidos dentais, e nem se estes ocorrem em uma intensidade que pode ser detectada de maneira prolongada em amostras de FGC.

Demonstrou-se aqui, pela primeira vez, que o clareamento dental com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> altera vias relacionadas ao estresse oxidativo e nitrosativo, e que estas alterações podem ser detectadas em amostras de FGC, através de coleta simples e não invasiva (com periopaper), podendo assim, ser úteis no acompanhamento de possíveis efeitos deletérios no paciente. O FGC é um exsudato de líquidos teciduais/plasma que atinge o sulco gengival, composto por uma mistura complexa de substâncias derivadas do soro sanguíneo, leucócitos, células estruturais do periodonto e microorganismos bucais, assim ele detém um grande potencial para servir como indicador de inflamação<sup>41</sup>.

Observou-se uma redução significativa nos níveis de NO nas amostras de pacientes submetidos à clareamento com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 35%, mas não naqueles submetidos a este agente em concentração reduzida (15%). Este efeito foi observado tão logo quanto 1 dia após a 1ª sessão de clareamento, e manteve-se reduzido por até 7 dias após esta sessão. Por outro lado, após a 2ª sessão, a liberação de NO retornou a níveis compatíveis com os produzidos antes do clareamento. Perfil semelhante foi observado na detecção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nas

mesmas amostras de FGC. Por outro lado, ambas as concentrações de peróxido causaram aumento da atividade da MPO, e este efeito foi mantido por todo o período de avaliação. Estes dados indicam que ambas as concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> são capazes de causar inflamação tecidual, e que as moléculas envolvidas neste processo diferem de acordo com a concentração de agente clareador utilizado.

Estudos indicam que o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 38% utilizado em consultório causa inflamação a nível pulpar, resultando em migração de macrófagos, angiogênese e dano de polpa<sup>42,43</sup>, e que este efeito é concentração-dependente, com danos mais reduzidos quando menores concentrações deste agente clareador são utilizadas. Neste estudo, o clareamento dental ocasionou um processo inflamatório que se perpetuou por 2 semanas pós-término dos procedimentos, entretanto, mais estudos são necessários para a determinação da extensão da inflamação, i.e., sua ocorrência a nível pulpar e/ou tecidos moles.

A análise proteômica do FGC demonstrou uma alteração não apenas na abundância mas também nos tipos de proteínas associadas à síntese de NO, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e regulação de neutrófilos ao longo do período de clareamento dental em comparação à condições pré-clareamento. Enzimas como MAPK quinase 4, molécula adaptadora 1 contendo o domínio TIR, NADH desidrogenase [ubiquinona] flavoproteína 3 mitocondrial e nitrato redutase, associadas com a síntese de NO, foram detectadas em ambos os grupos de pacientes submetidos a agentes clareadores. Observou-se que enzimas proteínas dessa classe são induzidas gradativamente ao longo do período de tratamento em indivíduos submetidos a agentes clareadores 15%; e que



pacientes submetidos à concentrações elevadas de  $H_2O_2$  não expressam estas proteínas 7 dias após a 1ª sessão. Isso pode explicar a redução na produção de NO detectada pelo método de Griess, neste tempo de avaliação. Um aumento progressivo de proteínas associadas ao estresse oxidativo foi detectado ao longo dos 21 dias de observação pós-1ª sessão de clareamento dental induzido por ambas concentrações testadas de  $H_2O_2$ . Entretanto, os níveis de  $H_2O_2$  encontraram-se reduzidos 7 dias após aplicação dos agentes clareadores. Oxidoredutases como JHDM1D, NADH-ubiquinona oxidoredutase de cadeia 2, NADH-ubiquinona oxidoredutase subunidade 5, NADH desidrogenase [ubiquinona] flavoproteína 3, desidrogenase/reductase 2-isoforma 2, retinol desidrogenase 14, proteína secretória epididimal Li 55, peroxiredoxin-5 mitochondrial e EGLN3, e a proteína antioxidante S100-A8 foram detectadas em ambos os grupos de pacientes, 7 dias após a 1ª sessão. Apesar de oxidoredutases como citocromo P450 2D6, NADH desidrogenase [ubiquinona] flavoproteína 3, EGLN3 e proteína secretória epididimal Li 55; e da proteína antioxidante S100-A8 serem detectadas 21 dias após a 1ª sessão, proteínas sensoras e reguladoras da produção de moléculas oxidantes (anexina, receptores de potencial transitório V1 e M2) também foram observadas nas mesmas amostras. Essa alteração na expressão de reguladores de moléculas oxidantes pode explicar pelo menos em parte o retorno dos níveis de  $H_2O_2$  à semelhantes aos basais, neste tempo de observação. De fato, em condições pré-clareamento, amostras de FGC apresentaram oxidoredutases, moléculas antioxidantes e sensores/reguladores de estresse oxidativo (receptor canabinoide tipo 1, receptor para ACh alfa 4 neuronal e proteína transmembrana do tipo 1).

Diferentes proteínas reguladoras de quimiotaxia, ativação e degranulação de neutrófilos foram detectadas nas amostras de FGC tanto em condições basais quanto pós-clareamento, sendo a maior abundância de proteínas dessa natureza encontradas em amostras de pacientes submetidos à clareamento com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 15%, 21 dias pós-início do tratamento. Em amostras obtidas de ambas as concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, foram observadas proteínas associadas à ativação e degranulação de neutrófilos (queratina 1, S100-A8, proteína catiônica de eosinófilos, defensina 1 de neutrófilos, tirosina fosfatase beta do tipo receptor, molécula adaptadora 1 contendo domínio TIR, resistina) neste tempo de estudo, entretanto, proteínas associadas à quimiotaxia e morte de neutrófilos (inositol-trisfosfato 3-quinase B e anexina) foram detectadas somente para a concentração de 15%. Em condições pré-clareamento, proteínas relacionadas à migração, ativação e degranulação de neutrófilos foram detectadas (beta-defensina 119, NF-kappa-B subunidade p105, proteína quinase serina/treonina 10, hornerina, quinase dependente de calcium/calmodulin tipo 1D, cadeia variável de Ig 3-11, S100-A8, maltase-glucoamilase, ATPase transportadora de fosfolipídios 8AI, N-acetilgalactosamina-6-sulfatase e N-acilesfingosine amidohidrolase 1).

Para ambas as concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, houve aumento na abundância de proteínas relacionadas danos de ácidos nucleicos 7 dias após o clareamento dental, porém somente para a concentração de 15% observou-se aumento na proporção de proteínas associadas à sobrevivência celular em comparação com condições pré-clareamento. Ainda, proteínas regenerativas teciduais encontram-se reduzidas neste tempo de avaliação para o clareamento 15%, mas não para o 35%. Por outro lado, proteínas de sobrevivência estão

aumentadas somente em pacientes submetidos ao clareamento com concentração reduzida de  $H_2O_2$ , 7 dias pós-clareamento.

Vinte e um dias após o clareamento, ocorre retorno na abundância de proteínas relacionadas à danos de ácidos nucleicos em ambas concentrações de  $H_2O_2$ ; entretanto, proteínas de regeneração e sobrevivência celular (promotoras de angiogênese, re-epitelização, proliferação de fibroblastos, regeneração nervosa, osteoclastogênese, e produção de dentina) e encontram-se aumentadas somente na concentração menor do agente clareador. Estes dados nos permitem sugerir a existência de um processo inflamatório mais exacerbado em pacientes com clareamento 35%, o qual se perpetua por todo o período de observação pós-início de tratamento.

Seguindo esta hipótese, e considerando que o NO e  $H_2O_2$  são produzidos constitutivamente por células do endotélio, neurônios e/ou queratinócitos<sup>45,46,47</sup>, sugere-se que o clareamento com  $H_2O_2$  35% causa dano de células produtoras de NO (neurônios e células endoteliais) e que ambas as concentrações promovem dano de células produtoras de  $H_2O_2$  como queratinócitos.; 7 dias após o clareamento. Em tempos posteriores (21 dias pós-1ª sessão), observou-se restauração dos níveis creviculares de NO e  $H_2O_2$ , e que isto pode estar relacionado à: i) aumento de proteínas de sobrevivência celular e regeneração tecidual, além de ativação de neutrófilos no clareamento 15%, e ii) continuidade da ativação de neutrófilos ainda presentes na região, além da reconstituição de proteínas associadas à síntese de NO, na presença de redução na abundância de proteínas regenerativas.

## CONCLUSÕES

De acordo com nosso estudo, foi possível concluir que:

1. O clareamento com agentes a base de  $H_2O_2$  causa inflamação independente da concentração utilizada.

2. Sistemas clareadores à base de  $H_2O_2$  35% podem resultar em um quadro inflamatório mais prolongado.

3. Considerando a eficácia de ambas as concentrações de  $H_2O_2$  no clareamento dental, sugere-se que o uso de concentrações mais baixas resultariam em menores danos teciduais no paciente.

## REFERÊNCIAS

1. Hasson H, Ismail AI, Neiva G. Home-based chemically-induced whitening of teeth in adults. *Cochrane Database Syst Rev*. 2006 Oct 18;(4):CD006202.
2. Aushill TM, Hellwig E, Schmidale S, Sculean A, Arweiler NB. Efficacy, side effects and patients' acceptance of different bleaching techniques (OTC, in-office, at-home). *Oper Dent*. 2005; 30: 156–63.
3. Mondelli RFL, de Azevedo JFDG, Francisconi AC, de Almeida CM, Ishikiriyama SK. Comparative clinical study of the effectiveness of different dental bleaching methods - two year follow-up. *J Appl Oral Sci*. 2012; 20(4):435-43.
4. Bortolatto JF, Pretel H, Floros MC, Luiz ACC, Dantas AAR, Fernandez E, Moncada G, de Oliveira Jr OB. Low Concentration H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/TiO<sub>2</sub> in Office Bleaching: A Randomized Clinical Trial. *JDR Clinical Research Supplement*. vol. 93, issue 7, suppl n°. 1. July, 2014.
5. Basting RT, Amaral FL, Franca FM, & Florio FM (2012) Clinical comparative study of the effectiveness of and tooth sensitivity to 10% and 20% carbamide peroxide home-use and 35% and 38% hydrogen peroxide in-office bleaching materials containing desensitizing agents *Operative Dentistry* 37(5) 464-473.
6. Dahl JE, Pallesen U. Tooth Bleaching - a Critical Review of the Biological Aspects. *Crit Rev Oral Biol Med* 14(4):292-304 (2003).
7. Almas K, Al-Harbi M, Al-Gunaim M (2003) The effect of a 10% carbamide peroxide home bleaching system on the gingival health *J Contemp Dent Pract* 4(1):32-41.
8. McGrath C, Wong AH, Lo EC, Cheung CS (2005) The sensitivity and responsiveness of an oral health related quality of life measure to tooth whitening *J Dent* 33(8):697-702.
9. Santana MAP, Nahsan FPS, Oliveira AHA, Loguercio AD, Faria-e-Silva AL. Randomized Controlled Trial of Sealed In-Office Bleaching Effectiveness. *Brazilian Dental Journal* (2014) 25(3): 207-211.
10. Kugel G, Aboushala A, Zhou X, Gerlach RW (2002) Daily use of whitening strips on tetracycline-stained teeth: Comparative results after 2 months. *Compend Cont Educ Dent* 23(1<sup>a</sup>):29-34.

11. Leonard Junior RH, Bentley C, Eagle JC, Garland GE, Knight MC, Phillips C (2001) Nightguard vital bleaching: a long-term study on efficacy, shade retention, side effects, and patients' perceptions *J Esthet Restor Dent* 13(6):357-369.
12. Almeida AF, et al. Genotoxic potential of 10% and 16% Carbamide Peroxide in dental bleaching. *Braz Oral Res.* 2015;29(1):1-7.
13. Ribeiro DA, Marques MEA, Salvadori DMF. Study of DNA damage induced by dental bleaching agents in vitro. *Braz Oral Res* 2006;20(1):47-51.
14. Benetti AR, Valera MC, Mancini MN, Miranda CB, Balducci I. In vitro penetration of bleaching agents into the pulp chamber. *Int Endod J.* 2004; 37(2):120-4.
15. Camargo SE, Valera MC, Camargo CH, Mancini GMN, Menezes MM. Penetration of 38% hydrogen peroxide into the pulp chamber in bovine and human teeth submitted to office bleach technique. *J Endod.* 2007;33(9):1074-7.
16. Sato C, Rodrigues FA, Garcia DM, C.M.P. Vidal CMP, Pashley DH, Tjäderhane L, Carrilho MR, Nascimento FD, Tersariol ILS. Tooth Bleaching Increases Dentinal Protease Activity. *J Dent Res* 92(2):187-192, 2013.
17. Coldebella CR, Ribeiro AP, Sacono NT, Trindade FZ, Hebling J, Costa CA. Indirect cytotoxicity of a 35% hydrogen peroxide bleaching gel on cultured odontoblast-like cells. *Braz Dent J.* 2009;20(4):267-74.
18. Dantas CMG, Vivian CL, Ferreira LS, de Freitas PM, Marques MM. In vitro effect of low intensity laser on the cytotoxicity produced by substances released by bleaching gel. *Braz Oral Res.* 2010 Oct-Dec;24(4):460-6.
19. Cintra LTA, Benetti F, Ferreira LL, Gomes-Filho JE, Ervolino E, Gallinari MO, Rahal V, Briso ALF. Penetration Capacity, Color Alteration and Biological Response of Two In-office Bleaching Protocols. *Brazilian Dental Journal* (2016) 27(2): 169-175.
20. Ghalili KM, Khawaled K, Rozen D, Afsahi V. Clinical study of the safety and effectiveness of a novel over-the-counter bleaching tray system. *Clinical, Cosmetic and Investigational Dentistry* 2014;6 15–19.
21. Gutiérrez-Venegas G, Guadarrama-Solís A, Muñoz-Seca C, Arreguín-Cano JA. Hydrogen peroxide-induced apoptosis in human gingival fibroblasts. *Int J Clin Exp Pathol* 2015;8(12):15563-15572.

22. Vargas FS, Soares DG, Basso FG, Hebling J, Costa CAS. Dose-Response and Time-Course of  $\alpha$ -Tocopherol Mediating the Cytoprotection Of Dental Pulp Cells Against Hydrogen Peroxide. *Brazilian Dental Journal* (2014) 25(5): 367-371.
23. Liang S, Sa Y, Sun L, Ma X, Wang Z, Xing W, Jiang T, Wang Y. Effect of halogen light irradiation on hydrogen peroxide bleaching: an in vitro study. *Australian Dental Journal* 2012; 57: 277–283.
24. Firat E, Ercan E, Gurgan S, Yalcin Cakir F, Berker E. The Effect of Bleaching Systems on the Gingiva and the Levels of IL-1b and IL-10 in Gingival Crevicular Fluid. *Operative Dentistry*, 2011, 36-6, 572-580.
25. Kawamoto K, Tsujimoto Y. Effects of the hydroxyl radical and hydrogen peroxide on tooth bleaching. *J Endod.* 2004; 30(1):45-50.
26. Darley-USmar V, Wiseman H, Halliwell B. Nitric oxide and oxygen radicals: a question of balance. *FEBS Letters* 369 (1995) 131-135.
27. Heo SJ, Yoon WJ, Kim KN, Oh C, Choi YU, Yoon KT, et al. Anti-inflammatory effect of fucoxanthin derivatives isolated from *Sargassum siliquastrum* in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophage. *Food Chem Toxicol.* 2012 Jun 23;50(9):3336-42.
28. Clarkson PM, Thompson HS. Antioxidants: what role do they play in physical activity and health? *Am J Clin Nutr.* 2000; 72(2):637-46.
29. Rahman k. Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. *Clinical Interventions in Aging* 2007;2(2) 219–236.
30. Barreiros ALBS, David JM, David JP. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organism. *Quim. Nova*, Vol. 29, No. 1, 113-123, 2006.
31. Borges Jr. I, Moreira EAM, Wilhem Filho D, de Oliveira TB, da Silva MBS, Fröde TS. Proinflammatory and Oxidative Stress Markers in Patients with Periodontal Disease. Volume 2007, Article ID 45794, 5 pages doi:10.1155/2007/45794.
32. Li Y, Greenwall L. Safety issues of tooth whitening using peroxide-based materials. *British dental journal.* Volume 215, no. 1 jul 13, 2013.
33. Herrero ER, Boon N, Bernaerts K, Slomka V, Verspecht T, Quirynen M, Teughels W. Clinical concentrations of peroxidases cause dysbiosis in in vitro oral biofilms. *J Periodontal Res.* 2018 Mar 8.
34. Hampton MB, Kettle AJ, Winterbourn CC. Involvement of Superoxide and Myeloperoxidase in Oxygen-Dependent Killing of

- Staphylococcus aureus by Neutrophils. *Infection and immunity*, Sept. 1996, p. 3512–3517.
35. Hampton MB, Kettle AJ, Winterbourn CC. Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. *Blood*. 1998;92(9):3007-71.
  36. Nathan C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat Rev Immunol*. 2006;6(3):173-82.
  37. Navarro-Yepes J, Burns M, Anandhan A, Khalimonchuk O, et al. Oxidative Stress, Redox Signaling, and Autophagy: Cell Death Versus Survival. *Antioxidants & redox signaling*. Volume 21, Number 1, 2014.
  38. Mendes SJF, Sousa FIAB, Pereira DMS, Ferro TAF, Pereira ICP, Silva BLR, Pinheiro AJMCR, Mouchrek AQS, Monteiro-Neto V, Costa SKP, Nascimento JLM, Grisotto MAG, Da Costa R, Fernandes ES. Cinnamaldehyde modulates LPS-induced systemic inflammatory response syndrome through TRPA1-dependent and independent mechanisms. *International Immunopharmacology*, v. 34, p. 60-70, 2016.
  39. Bradley PP, Priebat DA, Christensen RD, Rothstein G. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *J Invest Dermatol*. 1982 Mar;78(3):206-9.
  40. Benetti F, Gomes-Filho JE, Ferreira LL, Sivieri-Araújo G, Ervolino E, Briso ALF, Cintra LTA. Concentration-dependent effect of bleaching agents on the immunolabelling of interleukin-6, interleukin-17 and CD5-positive cells in the dental pulp. *Int Endod J*. 2018 Jan 20.
  41. Uitto VJ, Overall CM, McCulloch C (2003) Proteolytic host cell enzymes in gingival crevice fluid. *Periodontol* 31(1):77-104.
  42. Vaz MM, Lopes LG, Cardoso PC, de Souza JB, Batista AC, Costa NL, Torres EM, Estrela C. Inflammatory response of human dental pulp to at-home and in-office tooth bleaching. *J Appl Oral Sci*. 2016;24(5):509-17.
  43. 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 Feb;42(2):185-98. doi: 10.1016/j.jdent.2013.10.021. Epub 2013 Nov 13.
  44. Akbari M, Nejat AH, Farkhondeh N, Moghadam SM, Hashemy SI, Mohammadipou HS. Does at-home bleaching induce systemic oxidative stress in healthy patients? 2016.doi: 10.1111/adj.12425.



45. Palmer RMJ, Ashton DS, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from l-arginine. *Nature*, 1988; 333:664-6.
46. Wiesinger H. Arginine metabolism and the synthesis of nitric oxide in the nervous system. *Prog Neurobiol*, 2001; 64:365-91.
47. Wu G, Morris Jr SM. Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. *Biochem J*, 1998; 336:1-17.
48. Lima SNL, Ribeiro IS, Grisotto MA, Fernandes ES, Hass V, Tavares RRJ, Pinto SCS, Lima DM, Loguercio AD, Bandeca MC. Evaluation of several clinical parameters after bleaching with hydrogen peroxide at different concentrations: A randomized clinical trial. *Journal of Dentistry* 68 (2018) 91–97.

**Tabela 1. Efetividade do clareamento dental com agentes à base de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 15 e 35% .**

A efetividade foi avaliada qualitativamente por Vita Classic e Vita Bleachedguide, e quantitativamente por espectrofotometria em Vita Easyshade. A eficácia foi avaliada antes (basal) e em diferentes tempos após o clareamento, realizado em 2 sessões.

	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 15%		H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 35%	
	(Média ± EPM)		(Média ± EPM)	
	7 dias	21 dias	7 dias	21 dias
ΔE (Vita Easyshade)	5,9 ± 0,7	6,6 ± 0,77	5,87 ± 0,97	6,88 ± 0,6
ΔSGU (Vita Bleache)	2,22 ± 0,23	3,59 ± 0,39*	2,4 ± 0,25	4,00 ± 0,30*
ΔSGU (Vita Classic)	4,72 ± 0,46	5,27 ± 0,52	5,04 ± 0,53	5,86 ± 0,51

Média ± erro padrão da média (EPM); \* $p \leq 0.05$ ; difere do clareamento no tempo 7 dias.

**Tabela 2. Abundância de proteínas associadas à produção de NO, estresse oxidativo, regulação de neutrófilos, danos em ácidos nucleicos, sobrevivência celular e regeneração tecidual em amostras de FGC obtidas de pacientes submetidos à clareamento dental com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (15-35%) em diferentes tempos experimentais**

		<b>Síntese de NO</b>	<b>Estresse oxidativo</b>	<b>Regulação de neutrófilos</b>	<b>Dano em ácidos nucleicos</b>	<b>Sobrevivência celular</b>	<b>Regeneração tecidual</b>
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 15%</b>	<b>Basal</b>	0%	3,9%	2,3%	3,9%	9,7%	5,1%
	<b>7 dias</b>	0,5%	4,5%	3,2%	4,5%	10,4%	2,3%
	<b>21 dias</b>	1,3%	5,8%	6,5%	2,6%	11,7%	6,5%
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 35%</b>	<b>Basal</b>	0,3%	1,7%	2,6%	2,0%	8,5%	5,4%
	<b>7 dias</b>	0%	2,4%	2,8%	3,1%	8,6%	5,1%
	<b>21 dias</b>	0,4%	2,7%	1,3%	2,2%	8,9%	3,6%

Os resultados estão expressos como porcentagem (%) em relação ao número total de proteínas detectadas em cada tempo experimental

**Tabela 3. Identificação de proteínas associadas produção de NO, estresse oxidativo, regulação de neutrófilos, danos em ácidos nucleicos, sobrevivência celular e regeneração tecidual em amostras de FGC obtidas de pacientes submetidos à clareamento dental com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 15%, em diferentes tempos experimentais**

Proteína	Basal					7 dias					21 dias							
	Síntese de NO	Estresse oxidativo	Regulação de neutrófilos	Dano em ácidos nucleicos	Sobrevivência celular	Regeneração tecidual	Síntese de NO	Estresse oxidativo	Regulação de neutrófilos	Dano em ácidos nucleicos	Sobrevivência celular	Regeneração tecidual	Síntese de NO	Estresse oxidativo	Regulação de neutrófilos	Dano em ácidos nucleicos	Sobrevivência celular	Regeneração tecidual
Abnormal spindle-like microcephaly-associated protein					+												+	
Active regulator of SIRT1					+						+							
Adenomatous polyposis coli protein											+							
Alpha-ketoglutarate-dependent dioxygenase FTO				+														
Alstrom syndrome 1, isoform CRA_c																	+	
Annexin													+	+				+
Ankyrin repeat and LEM domain-containing protein 2					+													
Apolipoprotein A-I																		+
ATP-binding cassette sub-family A member 12						+												
ATP-dependent DNA helicase									+									
Autophagy-related protein 16-1					+					+								
BM-016									+	+								
Breast and ovarian cancer susceptibility protein 2 truncated variant									+	+								
Cannabinoid receptor 1		+																
cDNA, FLJ94365										+								

<b>cdNA FLJ55119, highly similar to Homo sapiens ZW10 interactor (ZWINT), transcript variant 3, mRNA</b>											+						
<b>cdNA FLJ52316, highly similar to NADPH--cytochrome P450 reductase</b>										+							
<b>cdNA FLJ35792 fis, clone TESTI2005759, highly similar to Amphoterin-induced protein 2</b>						+											+
<b>CD45</b>											+						
<b>cdNA FLJ54646</b>																+	
<b>cdNA FLJ52401, highly similar to Integrin alpha-10</b>																+	
<b>cdNA FLJ14215 fis, clone NT2RP3003665, highly similar to Beta-ureidopropionase (EC 3.5.1.6)</b>													+				
<b>Centriolin</b>																	+
<b>Collagen alpha-6(VI) chain</b>							+										
<b>Cytochrome P450 2D6</b>																+	
<b>Cytoskeleton-associated protein 5</b>												+					
<b>Cyclin-G2</b>							+										
<b>Dehydrogenase/reductase (SDR family) member 2 isoform 2 variant</b>											+						
<b>Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 8</b>							+										
<b>DNA ligase 1</b>							+										
<b>Dual-specificity protein phosphatase 13 isoform B</b>																	+
<b>Dynaactin subunit 1</b>														+			
<b>Dynaactin subunit 2</b>																	+
<b>E3 ubiquitin-protein ligase RBBP6</b>													+				
<b>EGLN3 protein</b>			+								+					+	
<b>Elongation factor 1-alpha 2</b>							+										+
<b>Eosinophil cationic protein</b>																+	
<b>E3 SUMO-protein ligase RanBP2</b>																	+
<b>Fanconi anemia group D2 protein</b>												+		+			
<b>Frizzled-9</b>																	

GRAM domain-containing protein 4					+														
G2/mitotic-specific cyclin-B3																			+
Heat shock protein beta-7						+													
Histone H4						+													
Histone cluster 1, H1t						+						+							+
Histone H2A-Bbd type 1																			+
Histone acetyltransferase p300							+	+											
Hornerin						+			+					+					
Inositol-trisphosphate 3-kinase B																			+
JHDM1D protein											+								
Keratin 1																		+	+
Keratin, type II cytoskeletal 73									+										+
Keratin, type I cytoskeletal 14									+					+					+
Keratin, type II cytoskeletal 6B									+										
Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal									+										
Keratin, type I cytoskeletal 10									+										+
Keratin, type I cytoskeletal 16																			+
Keratin, type II cytoskeletal 6C																			+
Keratin, type II cytoskeletal 2 oral																			+
KI67 Antigen																			+
Kinesin-like protein KIF15																			+
Leukocyte-associated immunoglobulin-like receptor 1														+					
Maltase-glucoamylase																			+
MB																			+
Mediator of DNA damage checkpoint protein 1																			+
Membrane-associated guanylate kinase, WW and PDZ domain-containing protein 3																			+
Microtubule cross-linking factor 1																			+
MICOS complex subunit MIC60																			+
Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 4																			+

<b>MMS19 nucleotide excision repair protein homolog</b>				+															
<b>Mothers against decapentaplegic homolog 6</b>																		+	+
<b>Monocarboxylate transporter 1</b>										+									
<b>Myosin-9</b>										+									
<b>Nanos homolog 3</b>																			
<b>N-acetylgalactosamine-6-sulfatase</b>																			
<b>N-acylsphingosine amidohydrolase 1</b>																			
<b>NAD-dependent protein lipoamidase sirtuin-4, mitochondrial</b>																			
<b>NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 2</b>																			
<b>Netrin receptor UNC5D</b>																			
<b>Neutrophil defensin 1</b>																			
<b>Neuronal acetylcholine receptor alpha 4 subunit</b>																			
<b>Nicastrin</b>																			
<b>Nuclear receptor coactivator 1</b>																			
<b>Partner and localizer of BRCA2</b>																			
<b>Peroxiredoxin-5, mitochondrial</b>																			
<b>piRNA biogenesis protein EXD1</b>																			
<b>Phospholipid-transporting ATPase 8A1</b>																			
<b>Protein timeless homolog</b>																			
<b>Protein S100-A8</b>																			
<b>Protein NDRG4</b>																			
<b>Probable E3 ubiquitin-protein ligase HERC1</b>																			
<b>Protein phosphatase 1, catalytic subunit, alpha isoform</b>																			
<b>PSME2 protein</b>																			
<b>p53-induced death domain-containing protein 1</b>																			
<b>Rapamycin-insensitive companion of mTOR</b>																			
<b>Retinol dehydrogenase 14</b>																			
<b>Resistin</b>																			
<b>Receptor-type tyrosine-protein phosphatase beta</b>																			
<b>Ribosomal RNA processing protein 1 homolog B</b>																			

<b>RNA polymerase II-associated protein 3</b>					+														
<b>Serine/threonine-protein kinase mTOR</b>				+	+														
<b>Serine/threonine-protein kinase SMG1</b>				+															
<b>Serine/threonine-protein kinase 10</b>									+										
<b>Smoothelin</b>								+											
<b>Sorbitol dehydrogenase</b>		+																	
<b>Suppression of tumorigenicity 18 protein</b>																			+
<b>Tetratricopeptide repeat protein 28</b>					+														
<b>TIR domain-containing adapter molecule 1</b>													+		+				+
<b>Thymosin beta-4</b>								+											
<b>Topoisomerase (DNA) II binding protein 1</b>										+	+								
<b>Transmembrane protein 199</b>		+																	
<b>Tryptophan 2,3-dioxygenase</b>																			+
<b>Transient receptor potential cation channel subfamily M member 2</b>																			+
<b>Tudor domain-containing protein 1</b>					+														
<b>Uncharacterized protein DKFZp686C1178</b>		+																	
<b>Vacuolar protein sorting-associated protein 51 homolog</b>					+						+								
<b>WD repeat domain phosphoinositide-interacting protein 1</b>					+														
<b>5' exonuclease Apollo</b>					+														



**Tabela 4. Identificação de proteínas associadas produção de NO, estresse oxidativo, regulação de neutrófilos, danos em ácidos nucleicos, sobrevivência celular e regeneração tecidual em amostras de FGC obtidas de pacientes submetidos à clareamento dental com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 35%, em diferentes tempos experimentais**

Proteína	Basal					7 dias					21 dias							
	Síntese de NO	Estresse oxidativo	Regulação de neutrófilos	Dano em ácidos nucleicos	Sobrevivência celular	Regeneração tecidual	Síntese de NO	Estresse oxidativo	Regulação de neutrófilos	Dano em ácidos nucleicos	Sobrevivência celular	Regeneração tecidual	Síntese de NO	Estresse oxidativo	Regulação de neutrófilos	Dano em ácidos nucleicos	Sobrevivência celular	Regeneração tecidual
Abnormal spindle-like microcephaly-associated protein																		
Alternative protein HEPACAM2					+													+
Ataxin-2						+												
Autophagy-related protein 16-1																		+
ATP-dependent DNA helicase				+						+						+		
Alternative protein F7																		+
Alternative protein COMP																		+
B-cell lymphoma/leukemia 11B					+	+												+
Bcl-2-binding component 3																		+
Beta-defensin 119			+							+								
Bloom syndrome protein					+													
Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type 1D			+															
cDNA FLJ78763					+													
cDNA, FLJ96396, highly similar to Homo sapiens ERO1-like beta (S. cerevisiae) (ERO1LB), mRNA		+																

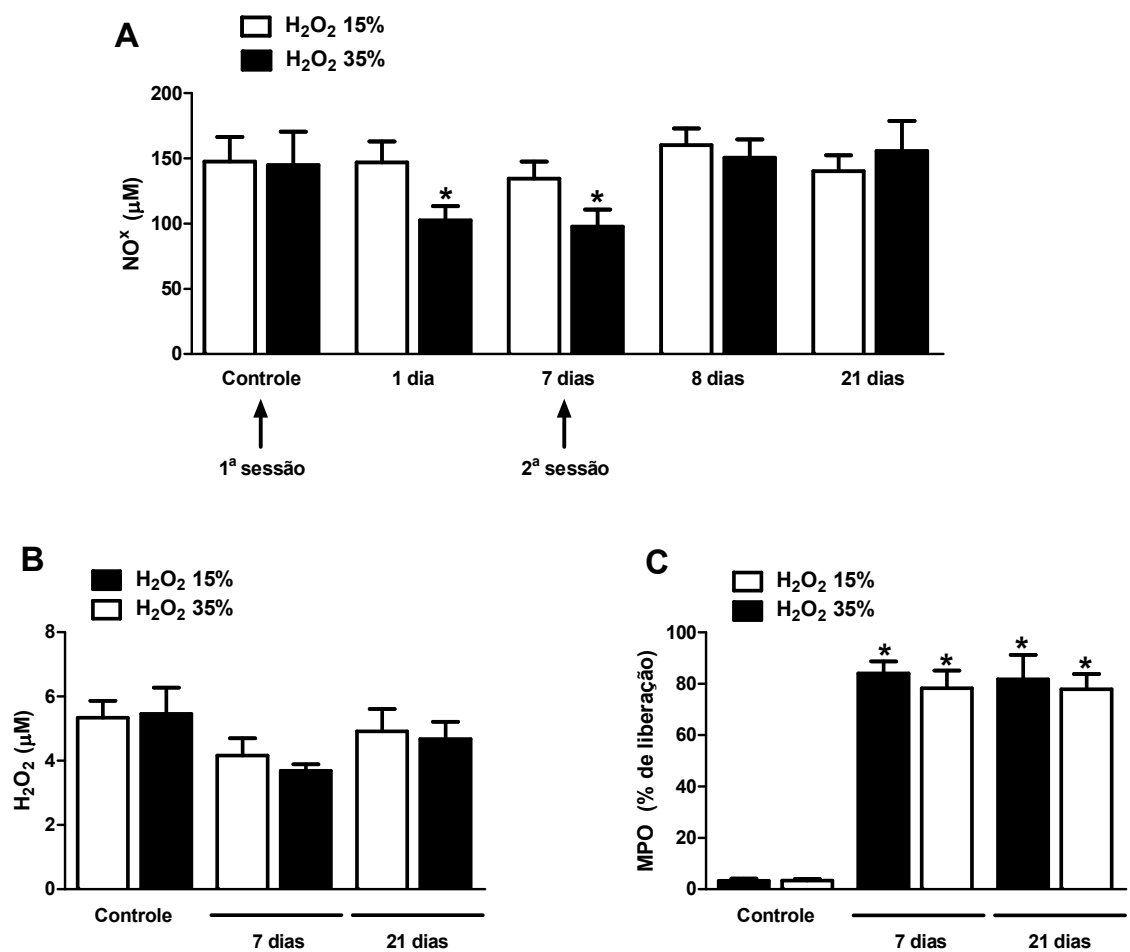
<b>cDNA FLJ53558, highly similar to Protein disulfide-isomerase A3 (EC 5.3.4.1)</b>		+																	
<b>cDNA FLJ50692, highly similar to RAD51-associated protein 1</b>		+		+															
<b>cDNA FLJ32673 fis, clone TESTI1000138, highly similar to Proprotein convertase subtilisin/kexin type 4 (EC 3.4.21.-)</b>		+																	
<b>Cytochrome P450 2A6</b>		+																	
<b>cDNA FLJ35792 fis, clone TESTI2005759, highly similar to Amphoterin-induced protein 2</b>													+						+
<b>cDNA FLJ42089 fis, clone TESOP2001166, highly similar to Suppressor of cytokine signaling 4</b>																			
<b>cDNA FLJ53267, highly similar to Optineurin</b>																			+
<b>cDNA FLJ77630, highly similar to Homo sapiens BPY2 interacting protein 1, mRNA</b>																			+
<b>Centrosomal protein 110kDa</b>																			+
<b>Cytochrome c oxidase subunit 7A2, mitochondrial</b>																			+
<b>Centromere protein C</b>																			+
<b>Collagen alpha-3(IV) chain</b>																			+
<b>Cytospin-A</b>																			+
<b>Dehydrogenase/reductase SDR family member 4-like 2</b>		+																	
<b>DNA-binding protein Ikaros</b>																			+
<b>DNA-binding protein inhibitor ID-1</b>																			+
<b>Dynactin subunit 1</b>																			+
<b>DNA repair protein-complementing XP-C cells</b>																			+
<b>Dual-specificity protein kinase TTK</b>																			+
<b>Enhancer of filamentation 1</b>																			+
<b>Epididymis secretory protein Li 55</b>		+																	+
<b>EGLN3 protein</b>		+																	+
<b>Elongation factor 1-alpha 2</b>																			+
<b>Eosinophil cationic protein</b>																			+
<b>E3 ubiquitin-protein ligase RBBP6</b>																			+

E3 ubiquitin-protein ligase PDZRN3						+													
E3 ubiquitin-protein ligase CHFR						+													
Fibronectin type III and SPRY domain-containing protein 1						+													
Flavin-containing monooxygenase																		+	
Folliculin-interacting protein 2						+	+						+						
Gasdermin-like isoform GSDML1						+													
G2/mitotic-specific cyclin-B3																		+	
Heat shock protein beta-7																			
Histone H4																		+	
Histone cluster 1, H1t						+													
Histone lysine demethylase PHF8													+						
Hornerin						+												+	
Homeo box A3																		+	
Hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase, mitochondrial																		+	
Immunoglobulin superfamily member 2																			+
Immunoglobulin superfamily member 10																			+
Immunoglobulin heavy variable 3-11						+													
Immunoglobulin heavy variable 3-23																			+
Inositol-trisphosphate 3-kinase B																			
Interleukin-1 receptor type 1						+												+	
Keratin, type I cytoskeletal 9																		+	+
Keratin, type I cytoskeletal 10																		+	
Keratin-associated protein 5-11																			+
Keratin, type I cytoskeletal 14																		+	
Keratin, type II cytoskeletal 6B																		+	
Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal																		+	
Keratin, type II cytoskeletal 3																		+	
Keratin, type I cytoskeletal 23																			+
Leucine-rich repeat protein SHOC-2																			+
Leucine-rich repeat serine/threonine-protein kinase 1																		+	

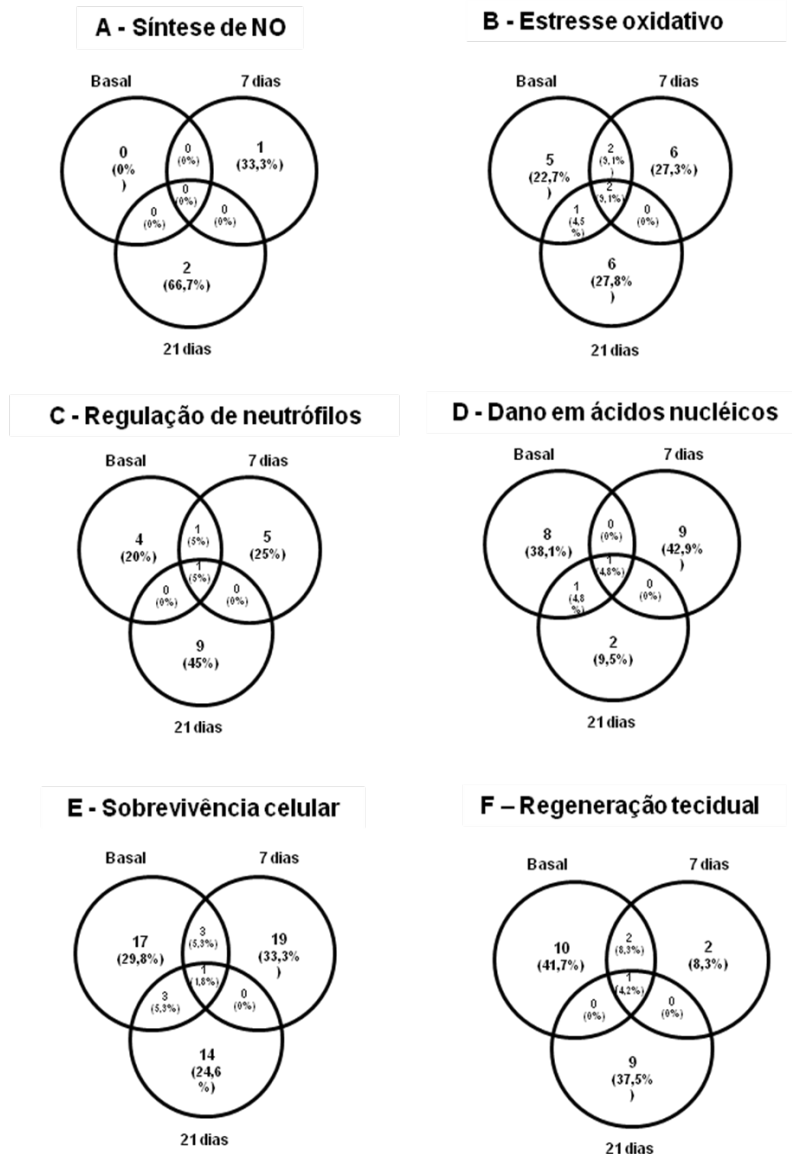
Meiosis-specific kinetochore protein						+													
Mitochondrial fission 1 protein						+													
Microtubule-actin cross-linking factor 1, isoforms 1/2/3/5													+						
Mutant xeroderma pigmentosum group C											+	+						+	
Microtubule cross-linking factor 1						+						+							+
Myocardin						+	+												
MTCH1 protein													+						
Mucin-1																			+
Nanos homolog 3													+						
NADH-ubiquinone oxidoreductase subunit 5										+									
NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 3, mitochondrial										+								+	
NT-3 growth factor receptor						+													
Neutrophil defensin 1											+								
Nuclear protein 1						+	+												
Nuclear receptor coactivator 1						+													
Nuclear factor NF-kappa-B p105 subunit																	+		
Nucleolar and coiled-body phosphoprotein 1																			+
O(6)-methylguanine-induced apoptosis 2						+													
Paired box protein Pax-1																			+
Partitioning defective 3 homolog																			+
Peroxiredoxin-5, mitochondrial																			
PRAME family member 14																			+
Protein ALEX																			+
Protein S100-A8																			+
Protein rogdi homolog																			+
Probable ribonuclease ZC3H12D						+													
Protein scribble homolog						+													
Poly [ADP-ribose] polymerase 4																			+
Probable E3 ubiquitin-protein ligase HERC1																			+
Protein phosphatase 1, catalytic subunit, alpha isoform						+													

Protein disulfide-isomerase A6																				+									+											
Pleckstrin homology domain-containing family M member 1																															+									
PH domain leucine-rich repeat-containing protein phosphatase 1																															+									
Ras-like protein family member 11B										+																														
Retinol dehydrogenase 14													+																			+								
Ribosomal RNA processing protein 1 homolog B										+																														
RNA-binding protein with multiple splicing 2																																	+							
Serine-protein kinase ATM																																	+							
Speedy protein C																																	+							
Serine/threonine-protein kinase 10										+																														
Seven transmembrane helix receptor																																	+							
Structure-specific endonuclease subunit SLX4																																								
Serine/threonine-protein kinase greatwall																																			+					
Serine/threonine-protein phosphatase 2A 56 kDa regulatory subunit gamma isoform																																					+			
SH2 domain-containing adapter protein B																																						+	+	
Sorting nexin-18																																						+		
Spectrin beta chain, non-erythrocytic 1																																						+		
Telomere-associated protein RIF1																																						+	+	
Transcription activator BRG1																																							+	
Transient receptor potential channel M2																																							+	
Transient receptor potential channel V1																																							+	
TRIO and F-actin-binding protein																																							+	
Tyrosine--tRNA ligase, cytoplasmic																																							+	
Thymosin beta-4																																							+	
Transmembrane protein 199																																								
Tyrosine-protein kinase receptor																																							+	
Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 3																																							+	
Uncharacterized protein KIAA1109																																							+	
Zinc finger and BTB domain-containing protein 38																																							+	

<b>WD repeat-containing protein 81</b>										+								
<b>60S ribosomal protein L28</b>																		+

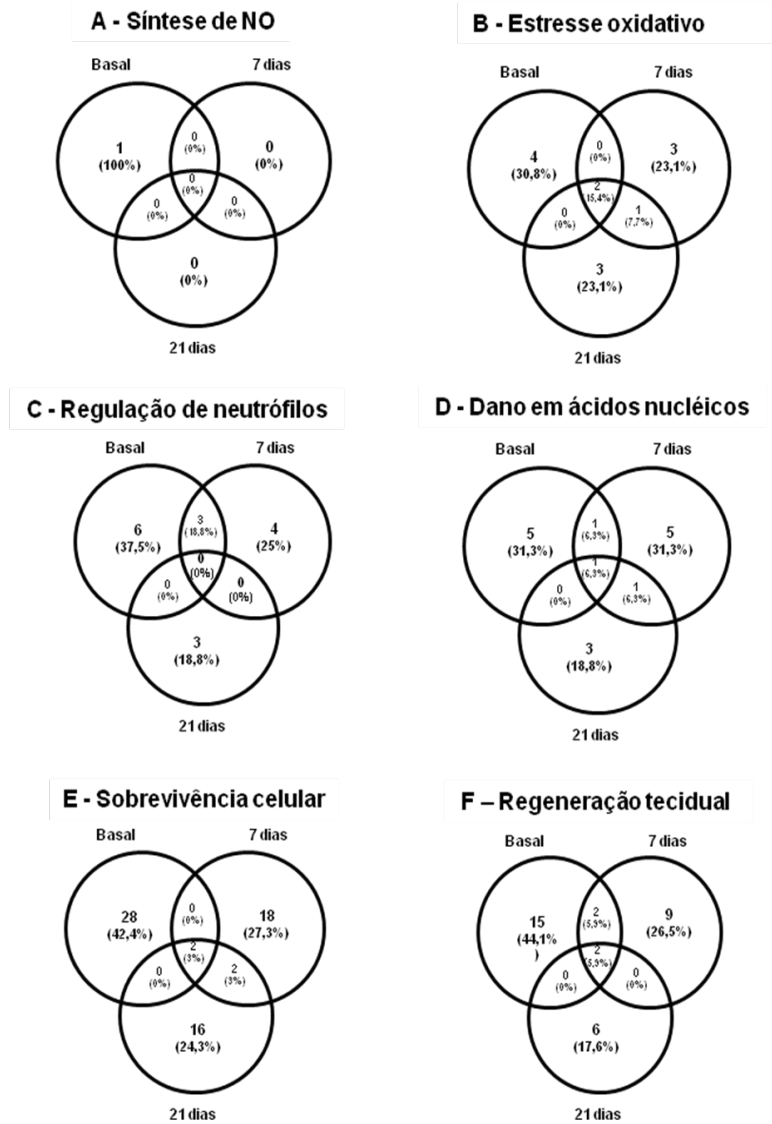


**Figura 1. Análise bioquímica de marcadores em amostras de fluido crevicular obtidas de pacientes submetidos à clareamento dental com agentes a base de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 15-35%), realizado em 2 sessões. Níveis de (A) óxido nítrico (NO<sup>x</sup>), (B) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e (C) porcentagem (%) de velocidade de liberação da mieloperoxidase (MPO) em amostras de fluido gengival crevicular coletadas antes (basal) e em diferentes tempos após o clareamento, realizado em 2 sessões. \* $p \leq 0.05$ ; \*difere do basal.**



**Figura 2. Abundância tempo-dependente de proteínas presentes em amostras de fluido crevicular obtidas de pacientes submetidos à clareamento dental com agentes a base de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 15%), realizado em 2 sessões. As proteínas foram classificadas de acordo com sua função biológica em: associadas com a síntese de NO, estresse oxidativo, regulação de neutrófilos, dano em ácidos nucleicos, sobrevivência celular e regeneração tecidual. As amostras de fluido gengival crevicular foram coletadas antes (basal) e em diferentes tempos após o clareamento, realizado em 2 sessões.**





**Figura 3. Abundância tempo-dependente de proteínas presentes em amostras de fluido crevicular obtidas de pacientes submetidos à clareamento dental com agentes a base de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 35%), realizado em 2 sessões. As proteínas foram classificadas de acordo com sua função biológica em: associadas com a síntese de NO, estresse oxidativo, regulação de neutrófilos, dano em ácidos nucleicos, sobrevivência celular e regeneração tecidual. As amostras de fluido gengival crevicular foram coletadas antes (basal) e em diferentes tempos após o clareamento, realizado em 2 sessões.**

## **APÊNDICE**

## APÊNDICE 1

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Comitê de Ética em pesquisa da Universidade Ceuma

Rua Josué Montello 1, São Luís, MA 65075-120. (98) 3235-0465

Você está sendo convidado (a) para participar, como voluntário (a), em uma pesquisa. Após ser esclarecido (a) sobre as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte do estudo, assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável.

#### INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA:

Título do Estudo: AVALIAÇÃO DO FLUIDO GENGIVAL E DA SENSIBILIDADE APÓS CLAREAMENTO COM PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES: ESTUDO CLÍNICO RANDOMIZADO

O clareamento dental é atualmente um dos procedimentos estéticos mais requisitados pelos pacientes, visto que, é possível de uma forma pouco invasiva conseguir um sorriso claro e harmônico. Entretanto pesquisas tem sido realizadas no intuito de esclarecer os possíveis danos que o produto utilizado no clareamento pode causar aos tecidos moles. Este estudo é importante porque vai avaliar a efetividade dos produtos clareadores, bem como a possibilidade de uma inflamação gengival provocada pelos agentes clareadores à base de peróxido de hidrogênio (água oxigenada). Este estudo

começará em novembro de 2015 e terminará em janeiro de 2017.

O estudo será feito da seguinte maneira: inicialmente será utilizada uma ficha para coleta de dados, onde serão registradas informações pessoais (nome, idade, sexo, endereço, telefone). Posteriormente será realizado um exame clínico para observar se o paciente se enquadra nos critérios de inclusão/exclusão do trabalho. Trata-se de um estudo clínico, com coleta de dados de pacientes antes, imediatamente após, 24hs após e 15 dias após clareamento dental com gel clareador. O procedimento bem como a coleta serão realizados com o uso de um protocolo e por um único pesquisador.

Os riscos que esta pesquisa apresenta são: durante e após o tratamento poderá haver sensibilidade dentária e/ou pequena irritação gengival transitória no colo dos dentes; o efeito do tratamento não é permanente, podendo haver uma recidiva da coloração do dente com o passar do tempo, dependendo dos

hábitos alimentares do paciente, quando poderá haver necessidade de novo tratamento.

Os benefícios que você deverá esperar de sua participação neste estudo, são: ter seus dentes mais claros e harmônicos esteticamente sem custos e que como o protocolo do estudo consta que o clareamento será realizado em duas sessões e que a coloração dos dentes obtida após o clareamento é variável e não pode ser prevista, pois depende principalmente da causa do escurecimento dos dentes; assim caso seja necessário será realizada uma terceira sessão pós o término da pesquisa. Adicionalmente os pacientes serem orientados sobre cuidados básicos de higiene oral e manutenção da saúde bucal.

Sempre que você desejar serão fornecidos esclarecimentos sobre cada uma das etapas do estudo. A qualquer momento, você poderá recusar a continuar participando do estudo e, também, poderá retirar seu consentimento, sem que para isto sofra qualquer penalidade ou prejuízo, ou seja, sem qualquer prejuízo da continuidade do seu acompanhamento odontológico.

Será garantido o sigilo quanto a sua identificação e das informações obtidas pela sua participação, exceto aos responsáveis pelo estudo, e a divulgação das mencionadas informações só será feita entre os profissionais estudiosos do assunto.

Você não será identificado(a) em nenhuma publicação que possa resultar deste estudo.

---

Assinatura Paciente

Pesquisador responsável: Suellen Nogueira Linares Lima

Telefone: (98)996180199

São Luis, \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**APÊNDICE 2**  
**FICHA CLÍNICA**

NOME: \_\_\_\_\_

COD. IDENT \_\_\_\_\_

DATA DE INÍCIO: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_ IDADE:

DATA DE NASC: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_ SEXO: ( ) F ( ) M

NATURALIDADE: \_\_\_\_ \_ NACIONALIDADE: \_\_\_\_

GRAU ESCOLARIDADE: \_\_\_\_\_

PROFISSÃO: \_\_\_\_\_

ENDEREÇO: \_\_\_\_\_

BAIRRO: \_\_\_\_\_ CEP: \_\_\_\_\_

ESTADO CIVIL:

( ) SOLTEIRO ( ) CASADO ( ) UNIÃO ESTÁVEL ( )

DIVORCIADO ( ) VIUVO

EMAIL: \_\_\_\_\_

TEL:(\_\_\_\_\_) \_\_\_\_\_ CEL:(\_\_\_\_\_) \_\_\_\_\_

DADOS SAÚDE:

MEDICAMENTO

## **ANEXOS**



CENTRO UNIVERSITÁRIO DO  
MARANHÃO - UNICEUMA



## PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** AVALIAÇÃO DO FLUIDO GENGIVAL APÓS CLAREAMENTO COM PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES: ESTUDO CLÍNICO RANDOMIZADO

**Pesquisador:** Suellen Nogueira Linares Lima

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 50080315.5.0000.5084

**Instituição Proponente:** centro universitario do maranhão-uniceuma

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 1.307.220

REGISTRO BRASILEIRO DE  
**Ensaios Clínicos**

USUÁRIO:  SENHA:   [Esqueceu a senha?](#)  
[Registrar-se](#)

[PT](#) | [ES](#) | [EN](#)

[NOTÍCIAS](#) | [SOBRE](#) | [AJUDA](#) | [CONTATO](#)

[BUSCA AVANÇADA](#)

[HOME](#) / [ENSAIOS REGISTRADOS](#) /

**RBR-4kkcd7**  
**Avaliação do fluido gengival após clareamento com peróxido de hidrogênio em diferentes concentrações: estudo clínico randomizado**  
Data de registro: 5 de Nov. de 2015 às 10:28  
Last Update: 2 de Junho de 2016 às 15:15

Tipo do estudo:  
Intervenções



**Involvement of oxidative and nitrosative stress in the crevicular response to hydrogen peroxide tooth whitening gels: a randomized clinical study**

\*manuscript to be submitted to Scientific Reports

## INTRODUCTION

Tooth whitening is currently a widely performed procedure, especially in the dental office. This is due to the increased awareness on that, aesthetically, white and well aligned teeth are standards of an ideal smile<sup>1</sup>. The techniques used for tooth whitening employ different whitening products which can be applied to the dental surface in varying concentrations and time of exposure<sup>2,3</sup>. The most commonly used whitening products are those containing hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ )<sup>4</sup> or carbamide peroxide at different concentrations (10-38%)<sup>5</sup>.

Despite the clinical efficacy of the in office whitening procedures<sup>6</sup>, adverse effects have been described for their usage including dental sensitivity<sup>7,8,9</sup>, soft tissue alterations<sup>10,11</sup>, genotoxicity<sup>12</sup> in bacterial and human cells<sup>13</sup>, pulp damage<sup>14,15,16</sup>, cytotoxicity<sup>17,18,19</sup>, in addition to gingival irritation<sup>3,20</sup>. The inflammatory effects of tooth whitening products have also been studied; however, the evidences gathered to date are controversial<sup>17,21,22,23,24</sup>.

$H_2O_2$ -based tooth whitening products are most frequently used in office<sup>22,23</sup>. Their efficacy is suggested to be concentration-dependent. Indeed, the higher the amounts of  $H_2O_2$  reactive molecules, the greater the production of free radicals and oxidative reactions, that in turn, increase the removal of pigmentation from the teeth<sup>14,18,19,25</sup>. On the other hand, it is possible that the produced free radicals induce tissue oxidative and nitrosative stress in the patient undergoing dental bleaching, as endogenous  $H_2O_2$  is widely known to participate in these responses<sup>26</sup>.

Although there are no evidences on whether tooth whitening causes oxidative and/or nitrosative stress in the gingival tissue or other dental structures, it is possible an inflammation occurs following the procedure<sup>21,22,23</sup>. The acute inflammatory response is a defense mechanism to harmful agents, characterized by leukocyte (neutrophils and macrophages) influx to the inflamed tissue; in order to protect the tissue from harm, these cells produce a range of inflammatory mediators that may result in either tissue damage or regeneration, depending on their concentrations<sup>27,28</sup>.

Oxidative stress occurs during inflammation as a result of an excessive generation of oxidants and reduced activation of antioxidant mechanisms<sup>26,29</sup>, leading to increased tissue damage. Oxidants include reactive oxygen species such as  $\text{H}_2\text{O}_2$ , superoxide anion ( $\text{O}_2^-$ ) and hydroxyl radicals ( $\text{HO}^\cdot$ ), this later, a highly reactive and deleterious oxidant<sup>30,31</sup>. In parallel to oxidative stress, nitric oxide (NO), is formed as the initial step to nitrosative stress<sup>30</sup>. NO can react with  $\text{HO}^\cdot$  to produce peroxynitrite ( $\text{ONOO}^-$ ), that in turn, causes tissue damage by altering DNA and cellular proteins and sometimes, loss of function<sup>14,31,32,33</sup>.  $\text{H}_2\text{O}_2$  can also react with myeloperoxidase (MPO), an enzyme produced in high amounts by neutrophils and used as a marker of their influx to inflamed tissues<sup>34,35,36</sup>. The activation of MPO can trigger the production of another oxidant, hypochlorous acid (HOCl) from  $\text{H}_2\text{O}_2$ , amplifying the formation of reactive oxygen species by neutrophils<sup>37</sup>.

We hypothesize that  $\text{H}_2\text{O}_2$  whitening products cause oxidative and/or nitrosative stress following in office application. Therefore, the levels of NO

and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> were investigated in gingival crevicular fluid samples obtained from patients undergoing dental bleaching. A proteomic analysis of these samples was also performed.

## **MATERIAL AND METHODS**

### **Patients**

The study was approved by the Human Research Ethics Committee of the Universidade CEUMA (protocol number 1.307.220) and was registered under the Brazilian Register of Clinical Assays (protocol number RBR-4kkcd7). A total of 25 healthy subjects (18-40 years old) presenting pigmented (color equal to or darker than A3) upper anterior teeth with pulp vitality, were recruited for participation in the study. All subjects presented good general and oral health and hygiene, with no history of periodontal disease or gingival retractions, dental restorations or carious lesions, bruxism, dental sensitivity and had not recently taken analgesic and/or anti-inflammatory drugs. Smokers, pregnant or lactating women, those who had previously undergone tooth whitening or endodontic treatment or had dental prosthesis or orthodontic appliances in the upper anterior teeth were excluded from the study. A written informed consent was obtained from each participant. A prophylaxis was performed in each participant on the week just prior to the beginning of the tooth whitening procedure.

### **Experimental groups**

This study was a randomized and double-blinded clinical trial. The mouth of each participant was split with an equal allocation rate of 1:1 for one of two treatments (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 15 and 35%). For this, treatments were labeled A and B, and were randomly assigned to each side of mouth of each subject by computer-generated tables prepared by a third person not involved in the research protocol ([www.sealedenvelope.com](http://www.sealedenvelope.com)). Details of the allocated group were recorded on cards contained in sequentially numbered, opaque, sealed envelopes. The envelopes were opened on the day of bleaching to prevent disclosure of the randomization scheme. All gels were prepared according to the manufacturer's instructions by a third person who handed over to the operator, the gels according to their previous allocation as A or B. The study was conducted at the clinic of the School of Dentistry of Local University from March 2016 to August 2016.

### **Tooth whitening procedure**

After prophylaxis, the initial color was registered and then, the bleaching procedure was performed. Before applying the whitening gel, the gingival tissue of the upper anterior teeth was isolated using a light-polymerized resin dam (Top Dam; FGM Prod. Odontol. Ltda., Joinville, SC, Brazil). The H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-containing bleaching products (Lase Peroxide Lite 15% and Lase Peroxide Sensy 35%; DMC Equip., São Carlos, SP, Brazil) were applied for 15 min, three times in each session, without using light. Two bleaching sessions were performed with a 1-week interval between them. Participants were instructed to brush their teeth regularly using toothpaste without a desensitizing or bleaching agent. Bleaching efficacy was determined by

comparison between the initial color shade and the one achieved post each session; by using the qualitative Vita Classic, Vita Bleachedguide and Vita Easyshade 3D (Vita Zahnfabrik, Bad Säckingen, Germany) and the quantitative Vita Easyshade spectrophotometry (Vident, Brea, CA, USA) techniques. All patients were evaluated over 21 days post first session. Efficacy results were calculated as previously described<sup>48</sup>.

### **Coleta do fluido gengival crevicular**

Gingival crevicular fluid (GCF) samples were collected for analysis. For this, the soft tissues were isolated with cotton rolls and the upper anterior teeth were gently dried with air for 5-10 s. The GCF was collected from the teeth number 11 and 21, by using Perio-paper strips (IDE Interstate, Amityville, NY, USA). Two strips were individually inserted into the sulcus of each tooth (1-2 mm depth), for 15 s. Strips containing blood were discarded and a novel sample was then collected from a different site of the same tooth. After sample collection, strips were immediately placed in sterile Eppendorf tubes and the GCF samples were stored at -80 °C for further analysis. Samples were collected prior to (baseline), 7 and 21 days after the beginning of the dental bleaching procedure.

### **Biochemical analysis of GCF samples**

#### **Sample preparation**

Paper strips containing GCF samples (1 from each tooth) were incubated with 160 µl of phosphate-buffered saline (PBS) for 10 min, with vortexing

at every 2 min of incubation. Then, samples were centrifuged at 3.000 rpm, for 5 min. The resulting supernatant was collected and kept at -80°C for further analysis of NO, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and MPO levels.

### **Quantification of NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/NO<sub>3</sub><sup>-</sup>**

The NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/NO<sub>3</sub><sup>-</sup> content was measured by the Griess assay as an indicator of NO production in GCF samples, according to the method described previously<sup>38</sup>. For this, 80 µl of sample were incubated with 20 µl of 1 U/ml nitrate reductase (Sigma-Aldrich) and 10 µl of 1 mM NADPH (Sigma-Aldrich) for 30 min at 37°C, in a 96-well plate. Then, 100 µl of Griess reagent (Sigma-Aldrich) was added and incubated for 15 min at 37°C. Absorbance at 550 nm was measured immediately using a spectrophotometer (Plate reader MB-580; Heales, Shenzhen, China). After subtraction of background readings, the absorbance in each sample was compared with that obtained from a sodium nitrite (0–100 µM) standard curve. Results are expressed as levels of NO<sup>x</sup> in µM.

### **Levels of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production was measured by using a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/peroxidase assay kit (Amplex Red H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Peroxidase assay kit; Molecular Probes, Invitrogen), as previously described<sup>38</sup>. Briefly, 50 µl of GCF were incubated with 50 µl of a solution containing NaPO<sub>4</sub> 0.05 M (pH 7.4), HRP 0.2 U/ml and Amplex Red Reagent (10-acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazine) 25.7 mg/ml, for 2h, at 37 °C. After incubation, the reaction was read at 560 nm. Absorbance

readings were compared with a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> standard curve (0-40 μM). Results are expressed as levels of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in μM.

### **MPO activity**

MPO activity in GCF samples was assessed as an indicative of neutrophil influx, by measuring the speed of oxidation of *o*-dianisidine in the presence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>39</sup>. Samples (25 μl) were added of an equal volume of a potassium phosphate solution (5 mM; pH 6.0) containing 0.5% HTAB (Sigma Chem. Co, USA). Then, the samples were sonicated for 20 s and incubated at 60°C for 2h, for inactivation of endogenous catalase. Then, samples were centrifuged at 10,000 g for 5 min. An aliquot (10 μl) of the supernatant was incubated with 200 μl of potassium phosphate (pH 6) containing 16.7 mg/ml *o*-dianisidine (Sigma Chem. Co., EUA) and 0.0005% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> per well in a 96-well plate. The speed of the formation of the oxidation product of *o*-dianisidine was read at 460 nm every 10 s for 10 min. MPO activity was calculated by comparing the initial and each registered absorbance. The results are expressed as the percentage (%) of maximum speed of reaction in comparison with the initial absorbance of each sample.

### **Proteomic analysis**

#### **Sample preparation**

For proteomic analysis, a pool of strips (1 of tooth) obtained from each time-point after exposure with the different bleaching products, were incubated with 150 μl of a solution containing 80% acetonitrile, 19.9%



distilled water and 0.1% trifluoroacetic acid, and were then, sonicated 3 times for 1 min. Samples were dried and resuspended in 1000  $\mu$ l of distilled water. Protein concentrations were then, determined in each pool of sample by using the Micro BCA assay kit (ThermoFisher, USA). Aliquots containing 10  $\mu$ g/pool of sample were dried, denatured and reduced by addition of 200  $\mu$ l of buffer 1 (pH 7.8; containing 4 M urea, 10 mM DTT and 50 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ). After 2 h, samples were added of 1000  $\mu$ l of buffer 2 (pH=7.8; 50 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ) and the proteins were digested for 18 h at 37°C, with 2% (w/w) sequencing-grade trypsin (Promega, Madison, WI, USA), samples were desalted (Zip Tip C-18, EMD Millipore Inc., Germany) and submitted to mass spectrometric analysis (LC-ESI-MS/MS).

### **Liquid chromatography by mass spectrometry**

Samples were resuspended in 97.5% distilled water/2.4% ACN/0.1% formic acid and then subjected to RP nLC-ESI-MS/MS, using a LTQ-Velos (Thermo Scientific, San Jose, CA, USA) mass spectrometer. LC aligned with the C18 column of capillary-fused silica (column length 10 mm, column id 75  $\mu$ m, 3  $\mu$ m spherical beads, and 100  $\text{\AA}$  pores size) was used, linked to the MS through ESI. The survey scan was set in the range of m/z values 390–2000 MS/MS. Peptides were eluted from the nanoflow RP-HPLC over a 65 min period, with linear gradient ranging from 5 to 55% of solvent B (97.5% ACN, 0.1% formic acid), at a flow rate of 300 nL/min, with a maximum pressure of 280 bar. The electrospray voltage was 1.8 kV and the temperature of the ion-transfer capillary was 300°C. After a MS survey scan range within m/z 390–2000 was performed and after selection

of the most intense ion (parent ion), MS/MS spectra were achieved via automated sequential selection of the seven peptides with the most intense ion for CID at 35% normalized collision energy, with the dynamic exclusion of the previously selected ions. The MS/MS spectra were matched with human protein databases (Swiss-Prot and TrEMBL, Swiss Institute of Bioinformatics, Geneva, Switzerland, <https://ca.expasy.org/sprot/>) using SEQUEST algorithm in Proteome Discoverer 1.3 software (Thermo Scientific, USA). The searches were performed by selecting the following SEQUEST parameters: (1) trypsin as protease enzyme, (2) 2 Da precursor ion mass tolerance, (3) 0.8 Da fragment ion mass tolerance, and (4) dynamic modifications of oxidized cysteine and methionine and phosphorylated serine and threonine. A maximum of four dynamic modifications per peptide were accepted. The SEQUEST score filter criteria applied to the MS/MS spectra for peptides were absolute XCorr threshold 0.4, fragment ion cutoff percentage 0.1, and peptide without protein XCorr threshold 1.5. Any nontryptic peptides passing the filter criteria were discarded. Only proteins for which two or more peptides were identified are reported in this study.

### **Statistical analysis**

The results are presented as the mean  $\pm$  standard error (SE). Statistical comparison was performed by analysis of variance of repeated measures followed by the Bonferroni test.  $p \leq 0.05$  were considered significant.

## **RESULTS**

### **The efficacy of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-containing products does not depend on the used concentration**

Table 1 demonstrates the efficacy of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-containing dental bleaching products, 7 and 21 days post the 1<sup>st</sup> application, in comparison with baseline measurements. Both concentrations of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (15-35%) presented similar efficacy, 7 and 21 days post-initial application, when evaluated by the Vita Bleachedguide technique. Although effective, the dental bleaching products did not produced differences over time, when evaluated by the Vita Classic and Vita Easyshade techniques.

### **Neutrophil migration and altered levels of NO and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> are detected in GCF samples after H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bleaching**

Figure 1A depicts the levels of NO in GCF samples obtained before and post-dental bleaching with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (15-35%). Whilst no differences were observed in the levels of this inflammatory mediator over time following application of 15% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, the application of 35% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> caused reduction (~31%) in the GCF concentration of NO from the day 1 to 7<sup>th</sup> post-1<sup>st</sup> session. After the 2<sup>nd</sup> bleaching session, the GCF levels of NO were similar to those detected at baseline conditions.

The levels of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> were also evaluated in the GCF samples. Although not significant, patients who undergone tooth whitening (15%-35%) presented with lower crevicular levels of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (21% and 33%, respectively), 7 days post-1<sup>st</sup> session. As for NO, these levels returned to baseline conditions at 21 days post-1<sup>st</sup> session (figura 1B).

Also, increased speed of MPO release was observed in GCF samples of patients who had undergone bleaching with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, independent of the used

concentration. Indeed, MPO levels were raised by 22-fold in comparison with baseline measurements (figura 1C).

### **Proteomic analysis**

Proteomic analysis detected 257 proteins in baseline samples obtained from subjects exposed to 15% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Post-bleaching, there was a declining in protein abundance with subjects presenting 222 (13.6% reduction) and 154 (40.1% reduction) proteins. Amongst the detected proteins (Table 3), there was a progressive increase in the percentage of proteins related with NO synthesis (from 0% at baseline conditions to 1.3% at 21 days post-1<sup>st</sup> session), oxidative stress (from 3.9% at baseline conditions to 5.8% at 21 days post-1<sup>st</sup> session), neutrophil regulation (from 2.3% at baseline conditions to 6.5% at 21 days post-1<sup>st</sup> session) and cell survival (from 9.7% at baseline conditions to 11.7% at 21 days post-1<sup>st</sup> session) (Table 2).

On the other hand, the same samples presented with a transient increase of proteins related with nucleic acid damage (from 3.9% at baseline conditions to 4.5% at 7 days post-1<sup>st</sup> session), with this group of proteins representing 2.6% of the total proteins detected at the end of the observation period (21 days post-1<sup>st</sup> session) (Table 2). Similarly, there was a transient reduction in the percentage of proteins associated with tissue regeneration, as 5.1% were observed in pre-bleaching conditions and 2.3% and 6.5% were registered at days 7 and 21 post-1<sup>st</sup> session, respectively (Table 2).

The GCF samples obtained from patients undergone 35% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bleaching were also evaluated. From the 353 proteins detected at pre-bleaching conditions, 255 (27.8% reduction) and 225 (36.3% reduction), were observed for days 7 and 21 post-1<sup>st</sup> session. Of the detected proteins (Table

4), a progressive increase was observed in the percentage of proteins associated with oxidative stress (from 1.7% at baseline conditions to 2.7% at 21 days post-1<sup>st</sup> session). The percentage of proteins associated with neutrophil regulation was stable until the 7<sup>th</sup> day post-1<sup>st</sup> session of bleaching, diminishing after 21 days (from 2.6% at baseline conditions to 1.3% at 21 days post-1<sup>st</sup> session). A similar profile was noted for proteins involved in tissue regeneration (from 5.4% at baseline conditions to 3.6% at 21 days post-1<sup>st</sup> session) (Table 2).

On the contrary, the same samples exhibited a transient increase of proteins associated with damage of nucleic acids (from 2.0% at baseline conditions to 3.1%), 7 days post-1<sup>st</sup> session, with their levels returning to 2.2% at the end of the observation period (21 days post-1<sup>st</sup> session) (Table 2). A similar response was observed for proteins associated with NO production, with these proteins representing 0.3% of the detected proteins at baseline conditions, and then, 0% and 0.4%, at days 7 and 21 post-1<sup>st</sup> session, respectively (Table 2). Proteins associated with cell survival remained stable throughout the bleaching procedure (8.5-8.9%) (Table 2).

Amongst the evaluated classes of proteins, some of them participate in different processes, as observed in tables 3 and 4. The Venn diagrams (figures 2 and 3), show the dynamics of the detected proteins over the observation period, with different proteins participating in a process in specific time-points.

## **DISCUSSION**

Previous studies showed that H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-containing tooth whitening products present similar efficacy irrespective of the concentration used<sup>5</sup>. Here, the

efficacy of the products tested was confirmed as by Vita Bleachedguide, Vita Classic and Vita Easyshade analysis, although time-dependent effects were only observed by using the Vita Bleachedguide technique. Indeed, this analysis showed a greater efficacy 21 days post-1<sup>st</sup> session

Although effective, the safety of the application of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gels is of debate, as deleterious effects in the patient's tissues/cells have been suggested for these products including dental sensitivity<sup>7,8,9</sup>, cytotoxicity and genotoxicity<sup>12</sup>, pulp damage and gingival irritations<sup>3,20</sup>, amongst others. Evidences also suggest that inflammation may occur following the application of dental bleaching, specially at pulp level<sup>14,15,16</sup>. These effects are suggested to be concentration-dependent<sup>35,40</sup>; however, there are no reports on that H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> triggers oxidative and/or nitrosative stress in dental tissues, and neither if they are relevant enough to be detected in a timely manner in GCF samples. Here, we demonstrated for the first time that tooth whitening products containing H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> alter these inflammatory pathways, and that these alterations can be detected in GCF samples, following a non-invasive and simple collection (with perio-paper); they therefore may be useful in the follow-up of possible deleterious effects in patient tissues. The GCF is an exsudate rich in serum, leukocytes, structural cells and microorganisms, and is possibly useful to indicate an ongoing inflammation post-dental procedures<sup>41</sup>.

A significant reduction in the levels of NO was detected only in patients who underwent bleaching with 35% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. This effect was observed as soon as 1 day after the 1<sup>st</sup> session of dental bleaching and remained low for 7 days post-session. On the other hand, after the 2<sup>nd</sup> session, the levels of NO

returned to those observed at baseline conditions. A similar profile was observed for the levels of crevicular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for both bleaching products. On the contrary, MPO activity was raised in patients undergoing bleaching irrespective of the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentration used, or the time of evaluation. These data indicate that both lower and elevated concentrations of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> cause inflammation; however, the molecules involved in this process may differ depending on the used concentration.

Previous studies demonstrated that the in office application of 38% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> causes pulp inflammation characterized by leukocyte migration, angiogenesis and tissue damage<sup>42,43</sup>; and that this effect is concentration-dependent with less damage occurring with the lowest concentrations of this bleaching product. Our study demonstrates increased inflammation following tooth whitening with both lower and higher concentrations of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and that this process continues for at least 2 weeks after the procedure terminated. This inflammatory process may result from pulp inflammation; however, possible damage may also occur at soft tissue level.

The proteomic analysis of the GCF samples showed that dental bleaching causes alterations in the abundance of proteins associated not only with NO and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> synthesis, but also with neutrophil influx.. Enzymes such as MAPK kinase 4, TIR-domain containing adaptor molecule 1, mitochondrial NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 3 and nitrate reductase, associated with NO synthesis, were detected in patients of both groups of bleaching. Proteins of this class are gradually increased by bleaching 15%; whilst those undergoing 35% bleaching do not express NO-related proteins

7 days post-1<sup>st</sup> session. This can be related to the lower detection of NO by the Griess method at this time-point.

An increased percentage of proteins associated with oxidative stress was observed during the 21-day observation period. However, the levels of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> were found to be reduced at the day 7 post-1<sup>st</sup> session, irrespective of the bleaching concentration. Oxidoreductases such as JHDM1D, NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 2, NADH-ubiquinone oxidoreductase subunit 5, NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 3, dehydrogenase/reductase 2-isoform 2, retinol dehydrogenase 14, epididymal secretory protein Li 55, mitochondrial peroxiredoxin-5 and EGLN3, and the antioxidant protein S100-A8 were detected in both groups of patients at the day 7 post-1<sup>st</sup> session. Despite the detection of oxidoreductases such as cytochrome P450 2D6, NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 3, EGLN3 and the epididymal secretory protein Li 55; and the antioxidant protein S100-A8; at 21 days post-1<sup>st</sup> session, the samples also presented proteins involved in the sensing and production of oxidant molecules (annexin and transient receptor potential channels M2 and V1). This alteration in the expression of regulators of oxidant molecules over time, explains, at least in part, the profile of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> release in patients after bleaching. Indeed, in pre-bleaching conditions, there is also the expression of oxidoreductases, antioxidant molecules and sensors/regulators of oxidative stress (cannabinoid receptor 1, neuronal Ach receptor alpha 4 and transmembrane protein type 1).

Different proteins that regulate neutrophil chemotaxis, activation and degranulation were detected in GCF samples in both pre- and post-



bleaching conditions. The largest abundance of proteins of this class were observed for patients who had undergone 15% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 21 post-1<sup>st</sup> session. Samples from both concentrations of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, presented proteins associated with the activation and degranulation of neutrophils (keratin 1, S100-A8, eosinophil cationic protein, neutrophil defensin, tyrosine-phosphatase beta receptor-like, TIR-domain containing adaptor molecule 1 and resistin) at this time point, however, proteins related with neutrophil chemotaxis and death (inositol-trisphosphate 3-kinase B and annexin) were only detected for the 15% concentration. Pre-bleaching conditions presented proteins associated with neutrophil migration, activation and degranulation (beta-defensin 119, NF-kappa-B subunit p105, kinase serine/treonine protein 10, hornerin, calcium/calmodulin-dependent kinase type 1D, Ig variable chain 3-11, S100-A8, maltase-glucoamylase, phospholipid-transporting ATPase 8A1, N-acetylgalactosamin-6-sulphatase and N-acylsphingosine amidohydrolase 1).

For both H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentrations tested, there was an increase in the abundance of proteins related with nucleic acid damage, 7 days post-1<sup>st</sup> session, but an increase in the percentage of cell survival proteins was only observed following 15% bleaching in comparison with pre-whitening conditions. Tissue regeneration proteins were reduced at 7 days for the 15% but not 35% bleaching.

Twenty one days following the 1<sup>st</sup> session of bleaching, there was a restoration in the percentage of proteins related to nucleic acid damage for both concentrations of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. On the other hand, those involved in tissue regeneration and cell survival (angiogenesis, re-epithelization, fibroblast

proliferation, neuronal regeneration, osteoclastogenesis and dentin production) were increased only for those undergoing bleaching with the lowest concentration of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. These evidences allow us to suggest the existence of an inflammatory process more exacerbated following tooth whitening with 35% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, which lasts for the whole observation period.

According to these findings, and considering that both NO and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> are constitutively produced by endothelial cells, neurons and/keratinocytes<sup>45,46,47</sup>, we can suggest that the 35% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bleaching damages the NO-producing cells (neurons and endothelial cells) and that both concentrations of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> causes damage in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-producing cells such as keratinocytes, 7 days post-1<sup>st</sup> session. In later time-points (21 days post-1<sup>st</sup> session), it was observed the restoration of the crevicular levels of NO and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; this can be related with: i) increased numbers of cell survival and tissue regeneration proteins, in addition to increased activation of neutrophils with 15% bleaching, and ii) ongoing neutrophil activation and restoration of proteins associated with NO synthesis, at the same time a reduction in the abundance of regenerative proteins, following bleaching with either products.

## **CONCLUSIONS**

Overall, our results suggest that:

1. In office tooth whitening procedures employing H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> present good efficacy, however, they cause inflammation irrespective of the used concentration.

2. The inflammation caused by 35% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> lasts for longer.

3. Considering the clinical efficacy of both H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentrations, patients may benefit better from using lower concentrations of this bleaching product, as its usage may result in less tissue damage.

**Table 1. Clinical efficacy of tooth whitening products containing different concentrations of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (15-35%)**

Clinical efficacy was determined by qualitative (Vita Classic and Vita Bleachedguide) and qualitative (spectrophotometry by Vita Easyshade).

Data was collected before (baseline) and at different time-points after the bleaching process initiated.

	15% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>		35% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	
	(Mean ± SE)		(Mean ± SE)	
	7 dias	21 dias	7 dias	21 dias
ΔE (Vita Easyshade)	5.9 ± 0.7	6.6 ± 0.77	5.87 ± 0.97	6.88 ± 0.6
ΔSGU (Vita Bleache)	2.22 ± 0.23	3.59 ± 0.39*	2.4 ± 0.25	4.00 ± 0.30*
ΔSGU (Vita Classic)	4.72 ± 0.46	5.27 ± 0.52	5.04 ± 0.53	5.86 ± 0.51

Mean ± standard error (SE); \* $p \leq 0.05$ ; differs from day 7.

**Tabela 2. Abundance of proteins associated with NO synthesis, oxidative stress, neutrophil regulation, nucleic acid damage, cell survival and tissue regeneration in GCF samples obtained from patients undergoing dental bleaching with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (15-35%).**

Samples were collected prior (baseline) and at different time-points after the bleaching process initiated

		<b>NO synthesis</b>	<b>Oxidative stress</b>	<b>Neutrophil regulation</b>	<b>Nucleic acid damage</b>	<b>Cell survival</b>	<b>Tissue regeneration</b>
<b>15% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	<b>Baseline</b>	0%	3.9%	2.3%	3.9%	9.7%	5.1%
	<b>7 days</b>	0.5%	4.5%	3.2%	4.5%	10.4%	2.3%
	<b>21 days</b>	1.3%	5.8%	6.5%	2.6%	11.7%	6.5%
<b>35% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	<b>Baseline</b>	0.3%	1.7%	2.6%	2.0%	8.5%	5.4%
	<b>7 days</b>	0%	2.4%	2.8%	3.1%	8.6%	5.1%
	<b>21 days</b>	0.4%	2.7%	1.3%	2.2%	8.9%	3.6%

Results are expressed as percentage (%) in relation with the total number of proteins detected in each time-point

**Tabela 3. Identification of proteins associated with NO synthesis, oxidative stress, neutrophil regulation, nucleic acid damage, cell survival and tissue regeneration in GCF samples obtained from patients undergoing dental bleaching with 15% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.**

Samples were collected prior (baseline) and at different time-points after the bleaching process initiated

Protein	Baseline						7 days						21 days						
	NO synthesis	Oxidative stress	Neutrophil regulation	Nucleic acid damage	Cell survival	Tissue regeneration	NO synthesis	Oxidative stress	Neutrophil regulation	Nucleic acid damage	Cell survival	Tissue regeneration	NO synthesis	Oxidative stress	Neutrophil regulation	Nucleic acid damage	Cell survival	Tissue regeneration	
<b>Abnormal spindle-like microcephaly-associated protein</b>					+													+	
<b>Active regulator of SIRT1</b>					+														
<b>Adenomatous polyposis coli protein</b>											+								
<b>Alpha-ketoglutarate-dependent dioxygenase FTO</b>				+															
<b>Alstrom syndrome 1, isoform CRA_c</b>																		+	
<b>Annexin</b>														+	+				+
<b>Ankyrin repeat and LEM domain-containing protein 2</b>					+														
<b>Apolipoprotein A-I</b>																			+
<b>ATP-binding cassette sub-family A member 12</b>						+													
<b>ATP-dependent DNA helicase</b>									+										
<b>Autophagy-related protein 16-1</b>					+						+								
<b>BM-016</b>											+								
<b>Breast and ovarian cancer susceptibility protein 2 truncated</b>											+								

<b>variant</b>																				
<b>Cannabinoid receptor 1</b>		+																		
<b>cDNA, FLJ94365</b>																				
<b>cDNA FLJ55119, highly similar to Homo sapiens ZW10 interactor (ZWINT), transcript variant 3, mRNA</b>																				
<b>cDNA FLJ52316, highly similar to NADPH--cytochrome P450 reductase</b>																				
<b>cDNA FLJ35792 fis, clone TESTI2005759, highly similar to Amphoterin-induced protein 2</b>																				
<b>CD45</b>																				
<b>cDNA FLJ54646</b>																				
<b>cDNA FLJ52401, highly similar to Integrin alpha-10</b>																				
<b>cDNA FLJ14215 fis, clone NT2RP3003665, highly similar to Beta-ureidopropionase (EC 3.5.1.6)</b>																				
<b>Centriolin</b>																				
<b>Collagen alpha-6(VI) chain</b>																				
<b>Cytochrome P450 2D6</b>																				
<b>Cytoskeleton-associated protein 5</b>																				
<b>Cyclin-G2</b>																				
<b>Dehydrogenase/reductase (SDR family) member 2 isoform 2 variant</b>																				
<b>Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 8</b>																				
<b>DNA ligase 1</b>																				
<b>Dual-specificity protein phosphatase 13 isoform B</b>																				
<b>Dynactin subunit 1</b>																				
<b>Dynactin subunit 2</b>																				
<b>E3 ubiquitin-protein ligase RBBP6</b>																				
<b>EGLN3 protein</b>																				
<b>Elongation factor 1-alpha 2</b>																				
<b>Eosinophil cationic protein</b>																				





Microtubule cross-linking factor 1						+						+						
MICOS complex subunit MIC60												+						
Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 4							+					+						
MMS19 nucleotide excision repair protein homolog							+											
Mothers against decapentaplegic homolog 6																	+	+
Monocarboxylate transporter 1											+							
Myosin-9							+											
Nanos homolog 3													+					
N-acetylgalactosamine-6-sulfatase							+											
N-acylsphingosine amidohydrolase 1							+						+					
NAD-dependent protein lipoamidase sirtuin-4, mitochondrial							+		+							+		+
NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 2											+			+	+			
Netrin receptor UNC5D																		+
Neutrophil defensin 1																	+	
Neuronal acetylcholine receptor alpha 4 subunit							+		+									
Nicastrin											+		+					
Nuclear receptor coactivator 1													+					
Partner and localizer of BRCA2												+	+					
Peroxiredoxin-5, mitochondrial							+				+							
piRNA biogenesis protein EXD1																		+
Phospholipid-transporting ATPase 8A1																	+	
Protein timeless homolog												+	+					
Protein S100-A8							+	+			+	+				+	+	+
Protein NDRG4																		+
Probable E3 ubiquitin-protein ligase HERC1																		+
Protein phosphatase 1, catalytic subunit, alpha isoform																		+
PSME2 protein													+					
p53-induced death domain-containing protein 1																		+
Rapamycin-insensitive companion of mTOR																		+
Retinol dehydrogenase 14																	+	



**Tabela 4. Identification of proteins associated with NO synthesis, oxidative stress, neutrophil regulation, nucleic acid damage, cell survival and tissue regeneration in GCF samples obtained from patients undergoing dental bleaching with 35% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.**

Samples were collected prior (baseline) and at different time-points after the bleaching process initiated

Protein	Baseline						7 days						21 days						
	NO synthesis	Oxidative stress	Neutrophil regulation	Nucleic acid damage	Cell survival	Tissue regeneration	NO synthesis	Oxidative stress	Neutrophil regulation	Nucleic acid damage	Cell survival	Tissue regeneration	NO synthesis	Oxidative stress	Neutrophil regulation	Nucleic acid damage	Cell survival	Tissue regeneration	
Abnormal spindle-like microcephaly-associated protein																			+
Alternative protein HEPACAM2					+														
Ataxin-2						+													
Autophagy-related protein 16-1																			+
ATP-dependent DNA helicase				+						+						+			
Alternative protein F7																			+
Alternative protein COMP																			+
B-cell lymphoma/leukemia 11B					+	+													+
Bcl-2-binding component 3																			+
Beta-defensin 119			+							+									
Bloom syndrome protein					+														
Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type 1D			+																
cDNA FLJ78763					+														
cDNA, FLJ96396, highly similar to Homo sapiens ERO1-like beta (S. cerevisiae) (ERO1LB), mRNA		+																	

<b>cDNA FLJ53558, highly similar to Protein disulfide-isomerase A3 (EC 5.3.4.1)</b>		+																	
<b>cDNA FLJ50692, highly similar to RAD51-associated protein 1</b>		+		+															
<b>cDNA FLJ32673 fis, clone TESTI1000138, highly similar to Proprotein convertase subtilisin/kexin type 4 (EC 3.4.21.-)</b>		+																	
<b>Cytochrome P450 2A6</b>		+																	
<b>cDNA FLJ35792 fis, clone TESTI2005759, highly similar to Amphoterin-induced protein 2</b>																			+
<b>cDNA FLJ42089 fis, clone TESOP2001166, highly similar to Suppressor of cytokine signaling 4</b>																			
<b>cDNA FLJ53267, highly similar to Optineurin</b>																			+
<b>cDNA FLJ77630, highly similar to Homo sapiens BPY2 interacting protein 1, mRNA</b>																			+
<b>Centrosomal protein 110kDa</b>																			+
<b>Cytochrome c oxidase subunit 7A2, mitochondrial</b>																			+
<b>Centromere protein C</b>																			+
<b>Collagen alpha-3(IV) chain</b>																			+
<b>Cytospin-A</b>																			+
<b>Dehydrogenase/reductase SDR family member 4-like 2</b>		+																	
<b>DNA-binding protein Ikaros</b>																			+
<b>DNA-binding protein inhibitor ID-1</b>																			+
<b>Dynactin subunit 1</b>																			+
<b>DNA repair protein-complementing XP-C cells</b>																			+
<b>Dual-specificity protein kinase TTK</b>																			+
<b>Enhancer of filamentation 1</b>																			+
<b>Epididymis secretory protein Li 55</b>		+																	+
<b>EGLN3 protein</b>		+																	+
<b>Elongation factor 1-alpha 2</b>																			+
<b>Eosinophil cationic protein</b>																			+
<b>E3 ubiquitin-protein ligase RBBP6</b>																			+

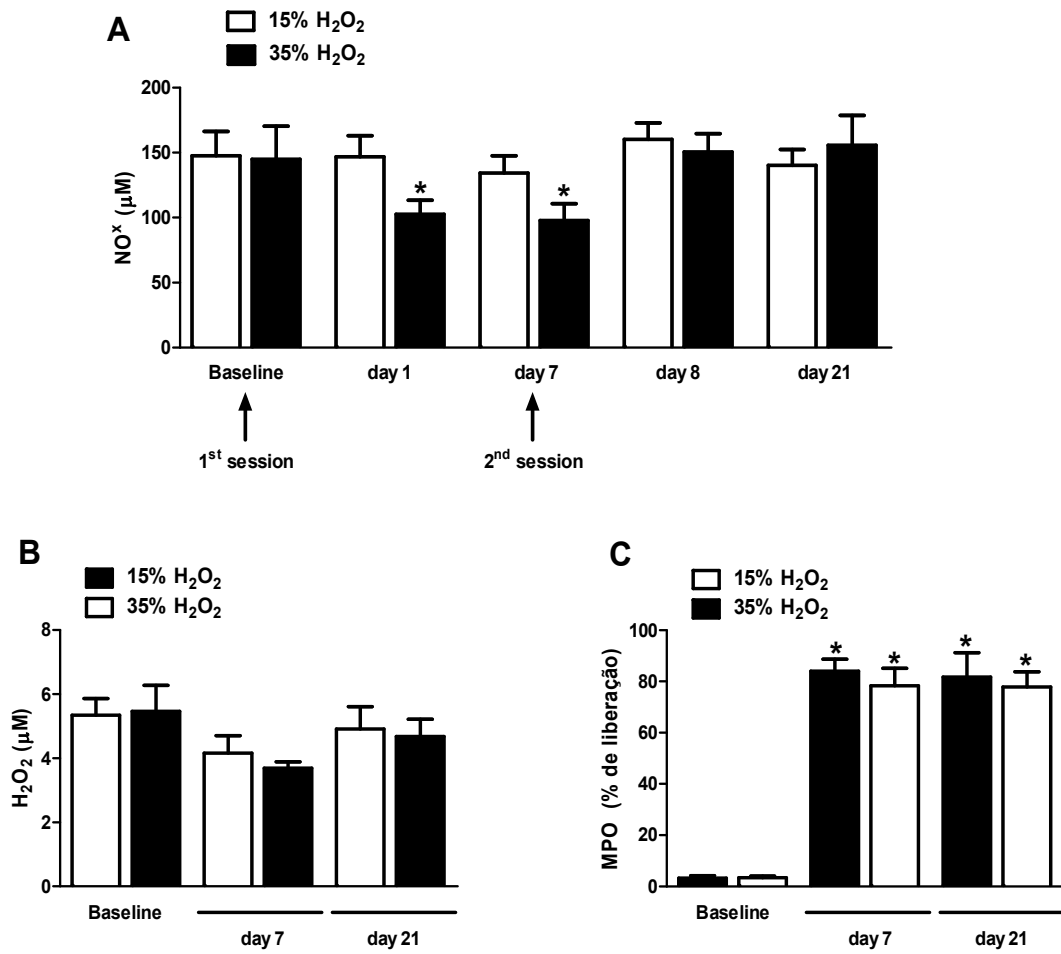
E3 ubiquitin-protein ligase PDZRN3						+													
E3 ubiquitin-protein ligase CHFR						+													
Fibronectin type III and SPRY domain-containing protein 1						+													
Flavin-containing monooxygenase																		+	
Folliculin-interacting protein 2						+	+						+						
Gasdermin-like isoform GSDML1							+												
G2/mitotic-specific cyclin-B3																			+
Heat shock protein beta-7																			
Histone H4																			+
Histone cluster 1, H1t							+												
Histone lysine demethylase PHF8																			+
Hornerin							+												+
Homeo box A3																			+
Hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase, mitochondrial																			+
Immunoglobulin superfamily member 2																			+
Immunoglobulin superfamily member 10																			+
Immunoglobulin heavy variable 3-11																			+
Immunoglobulin heavy variable 3-23																			+
Inositol-trisphosphate 3-kinase B																			+
Interleukin-1 receptor type 1																			+
Keratin, type I cytoskeletal 9																			+
Keratin, type I cytoskeletal 10																			+
Keratin-associated protein 5-11																			+
Keratin, type I cytoskeletal 14																			+
Keratin, type II cytoskeletal 6B																			+
Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal																			+
Keratin, type II cytoskeletal 3																			+
Keratin, type I cytoskeletal 23																			+
Leucine-rich repeat protein SHOC-2																			+
Leucine-rich repeat serine/threonine-protein kinase 1																			+

Meiosis-specific kinetochore protein					+														
Mitochondrial fission 1 protein					+														
Microtubule-actin cross-linking factor 1, isoforms 1/2/3/5													+						
Mutant xeroderma pigmentosum group C											+	+						+	
Microtubule cross-linking factor 1					+						+								+
Myocardin					+	+													
MTCH1 protein												+							
Mucin-1																			+
Nanos homolog 3													+						
NADH-ubiquinone oxidoreductase subunit 5										+									
NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 3, mitochondrial										+								+	
NT-3 growth factor receptor						+													
Neutrophil defensin 1											+								
Nuclear protein 1						+	+												
Nuclear receptor coactivator 1						+													
Nuclear factor NF-kappa-B p105 subunit																	+		
Nucleolar and coiled-body phosphoprotein 1																			+
O(6)-methylguanine-induced apoptosis 2						+													
Paired box protein Pax-1												+							
Partitioning defective 3 homolog													+						
Peroxiredoxin-5, mitochondrial																			
PRAME family member 14																			+
Protein ALEX												+							
Protein S100-A8													+					+	+
Protein rogdi homolog																			
Probable ribonuclease ZC3H12D						+													
Protein scribble homolog						+													
Poly [ADP-ribose] polymerase 4													+	+					
Probable E3 ubiquitin-protein ligase HERC1														+					
Protein phosphatase 1, catalytic subunit, alpha isoform						+													

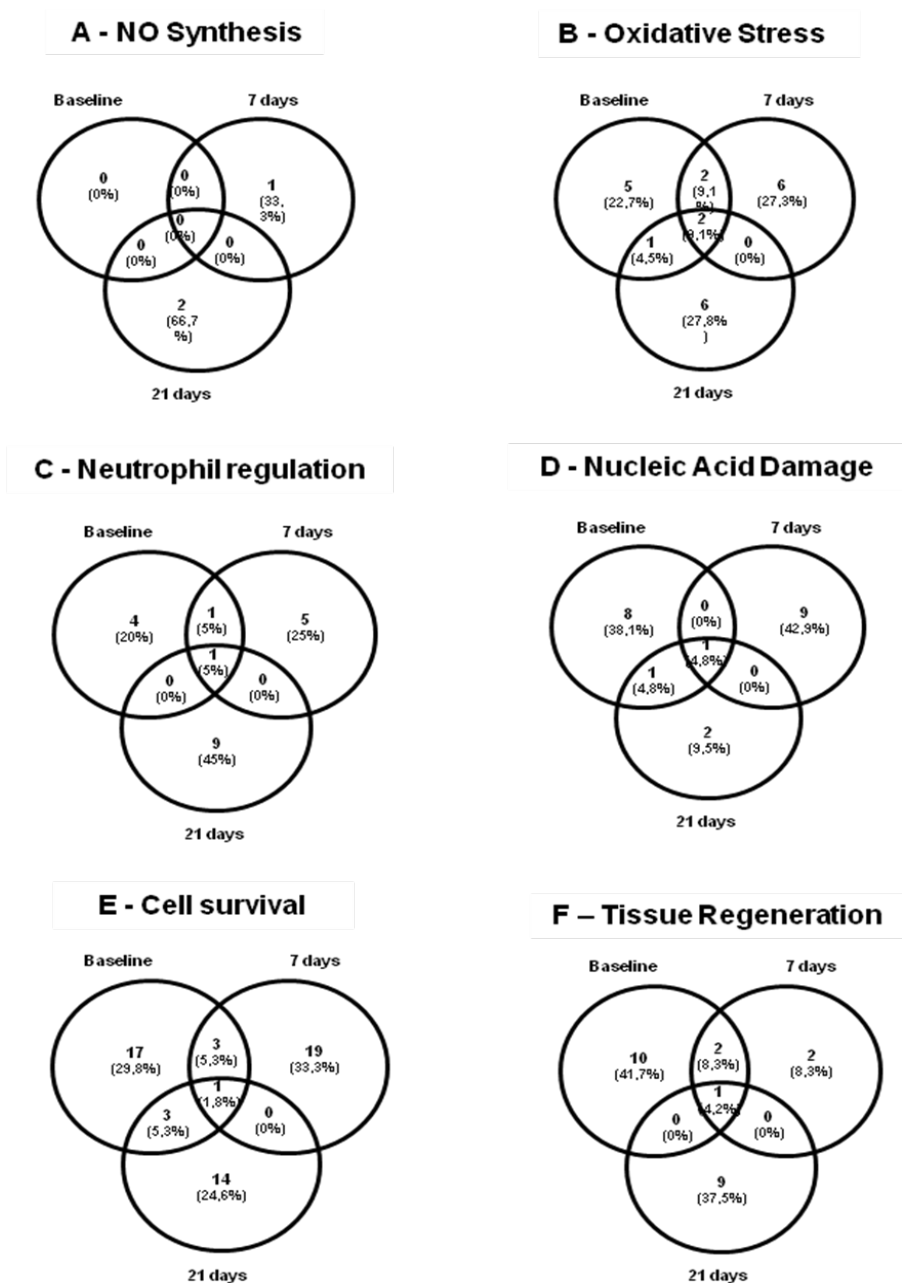


<b>WD repeat-containing protein 81</b>										+								
<b>60S ribosomal protein L28</b>																		+

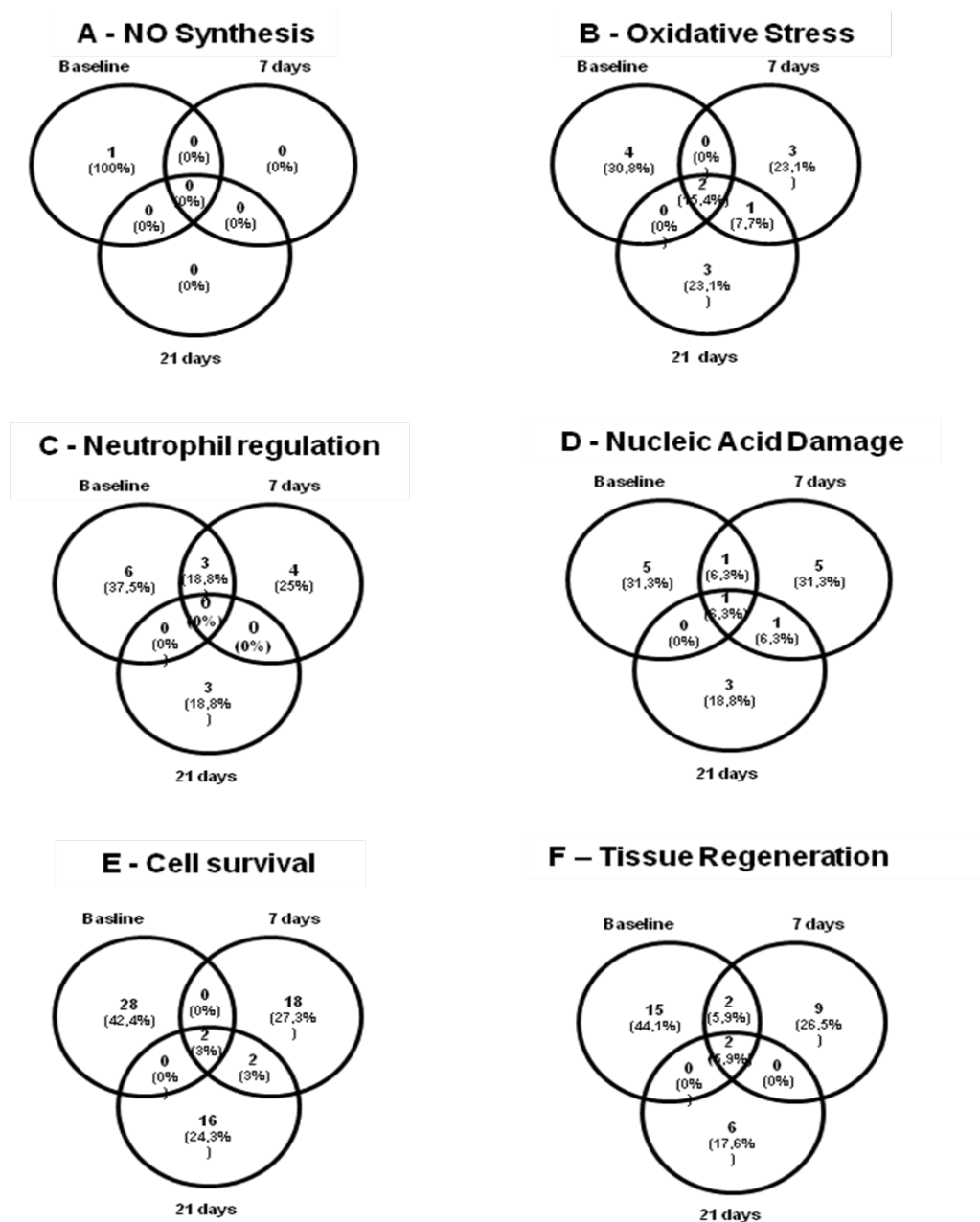




**Figure 1. Biochemical analysis of gingival crevicular fluid markers in patients undergoing a 2-session tooth whitening with products containing hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 15-35%).** Levels of (A) nitric oxide (NO<sup>x</sup>), (B) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and (C) percentage (%) of the speed of myeloperoxidase (MPO) release in gingival crevicular fluid samples collected before (baseline) and at different time-points after dental bleaching. \**p* ≤ 0.05; \*differs from baseline.



**Figure 2. Time-dependent abundance of proteins detected in gingival crevicular fluid samples obtained from patients undergoing a 2-session tooth whitening with hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 15%).** Proteins were classified by biological function as associated with: NO synthesis, oxidative stress, neutrophil regulation, nucleic acid damage, cell survival and tissue regeneration. Samples were collected before (baseline) and at different time-points after dental bleaching.



**Figure 3. Time-dependent abundance of proteins detected in gingival crevicular fluid samples obtained from patients undergoing a 2-session tooth whitening with hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 35%).** Proteins were classified by biological function as associated with: NO synthesis, oxidative stress, neutrophil regulation, nucleic acid damage, cell survival and tissue regeneration. Samples were collected before (baseline) and at different time-points after dental bleaching.