

Sistema de Clareamento BriteSmile
RELATÓRIO FINAL
ANÁLISE DA POLPA
AUTOR -Milton V. Marshall, Doutor, D.A.B. To
DATA DE CONCLUSÃO DO ESTUDO: 9 de Maio de 2002
CONDUZIDO POR:
Biotechnics, Inc.
310 Millstone Drive
Hillsborough, NC 27278
NÚMERO DE ESTUDO DO LABORATÓRIO
24-02
PÁGINA 1 DE 42
REALIZADO PARA:
BriteSmile, Inc.
490 N. Wiget Lane
Walnut Creek, CA 94598
INFORMAÇÃO DE ESTUDO CONFIDENCIAL
Clareador Dental
Sistema de Clareamento Dental BriteSmile
1221
31 de Janeiro de 2004
Gel Clareador
Constante para a duração do estudo
Refrigerado (2-8°C)
Rotina do Laboratório
BriteSmile, Inc.
Lote NºA27108, data de validade 31 de Julho de 2003
Lote Nº1104, data de validade 30 de Setembro de 2003
como fornecido
Macacos Cynomolgus
Dieta Certificada de Primatas Harlan Teklad
Ação-Teste:
Identificação do Material-Teste:
Lote Nº.
Data de Validade:
Descrição:
Estabilidade:
Condições de Armazenagem:
Precauções para Manuseio:
Fornecedor:
Material de Isolamento:
Creme Protetor (Masking Cream):
Preparo do Material-Teste:
Identificação do Sistema-Teste:
Dieta:
Nº2055
Químicos e Insumos:
2.00N H2SO4 Ricca Chemical Co.
0.100N KMnO4 Ricca Chemical Co.
H2O2 Mallinkrodt AR (ACS), 31,3%
Ácido Fórmico, 94,1%, ACS J.T. Baker Co.

ÁGUA -Biotechnics, Inc. dionizada, Buret Kimble 17027F-10 (T.D.)

Data de Início do Estudo:

Data de Conclusão do Estudo:

Ambiente-Teste (Estudo em vivos):

Lote N°2102285, data de validade: 30 de maio de 2002

Lote N°2107030, data de validade: 31 de dezembro de 2002

Lote N°524.0 745A05, data de validade: 30 de novembro de 2002

Lote N°V 15476, data de validade: 31 de dezembro de 2004

Analisado em 30 de Julho de 2001

N° de Série 8098, certificado em 31 de maio de 2001

9 de abril de 2002

9 de maio de 2002

LAB Pre-Clinical Research International Inc.

560 Cartier Blvd West, Laval, Quebec,

Canadá

Equipe do Estudo (com seres vivos):

Instalações de teste (histopatologia):

A.C. Zerouala, Médico Veterinário, Doutor.

Jean-Paul Descoteaux, Médico Veterinário, Doutor.

Shelley Watson, Bacharel em Química, Mestre

Imran Shaikh, Bacharel em Química

E.Hum, RAHT

A.M. Lajoie, RAHT

C. Perth, RAHT

Biotechnics, Inc.

310 Millstone Drive, Hillsborough, NC

Milton V. Marshall, Doutor, DABT

George A. Parker, Doutor em Medicina Veterinária, DACVP, DABT

Mark Forsell, AB, HT(ASCP)

Lynn Cates, HT

Equipe de Estudo (Histopatologia):

DECLARAÇÃO DE CONFORMIDADE

Este estudo foi conduzido de acordo com os procedimentos de operação padrão do LAB Pre-clinical Research International, Inc. e da Biotechnics, Inc. Nenhum desvio no protocolo de operação padrão ocorreu para afetar de forma adversa a integridade dos dados deste estudo.

""_

3 RESUMO CONFIDENCIAL

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do Sistema BriteSmile de Clareamento na polpa dental através da aplicação tópica em macacos Cynomolgus. Quatro fêmeas foram tratadas topicamente com o sistema de clareamento dental BriteSmile por um período de 20 minutos, que incluiu ativação por luz. Os animais foram sedados antes da aplicação com pentothal, e o material Teste foi aplicado em no mínimo dois dentes superiores e dois inferiores; os dentes opostos de cada lado não foram tratados e foram usados como controles. O gel de clareamento BriteSmile foi aplicado nos dentes em um único lado da boca (em ambas arcadas). Uma fonte de luz com comprimento de onda visível (400-505 nm) foi colocada a uma distância aproximada de 6 cm dos dentes em tratamento, e a esta foi direcionada nos dentes, por um período de 20 minutos. Este procedimento foi repetido duas vezes num total de tempo de exposição de 60 minutos; o gel de clareamento

resfriado foi aplicado antes de cada tratamento de 20 minutos.

Em seguida ao tratamento, 4 dentes superiores (2 tratados, 2 não tratados) e dois inferiores (1 tratado, 1 não tratado) foram extraídos 20 e 44 horas após o início, respectivamente. As extrações foram feitas sob anestesia por inalação (isoflurane). As raízes de todos os dentes foram quebradas, e os dentes foram colocados em uma solução neutra de formalina a 10% por 3 a 4 dias.

Após a fixação, os dentes foram descalcificados em ácido fórmico a 10%. Após o processamento, lâminas de múltiplas seções de cada dente foram separadas. As lâminas foram tingidas com hematoxilina e eosina (H&E) ou com tintura tricolor de Masson. Todas as lâminas foram avaliadas de “maneira cega” com relação às alterações derivadas do tratamento. Não foi observada nenhuma alteração nos dentes após a exposição ao sistema de luz BriteSmile.

MATERIAIS E MÉTODOS

Sistema-Teste

Os macacos foram selecionados de modo a atender os requerimentos regulatórios para o teste de segurança em espécies não roedoras, uma vez que a dentição dos primatas está mais proximamente relacionada à dos humanos que em outras espécies. Os macacos *Cynomolgus* disponibilizados para este estudo foram obtidos junto à “Covance Research Products Inc., P.O.Box 540, Alice, TX 78333” e Governo do Canadá, Health and Welfare Canadá, “Animal Research Division, Tunney's Pasture, Ottawa, Ontario KIA OL2”. No começo do tratamento, os animais tinham 3 a 4 anos e pesavam entre 3,7 a 5,0 kg.

Coordenação da Transferência de Animais

Foi feita a partir da colônia reserva do LAB Pre-Clinical Research International Inc. com a realização de um exame detalhado e pesagem de todos os animais, sob a orientação de um veterinário clínico. Os animais foram identificados um a um pelo fornecedor através de uma tatuagem permanente no peito. Após a classificação de cada animal, as jaulas foram etiquetadas de forma clara com um cartão colorido codificado para cada jaula, com o número do estudo, número do animal, sexo, e tratamento. Os macacos foram abrigados separadamente em jaulas de aço não corrosíveis e equipadas com sistema de bebedouro automático. O ambiente da sala dos animais foi controlada da seguinte maneira: temperatura 21:1:30 C, umidade 30-70%, 12 horas com luz e 12 horas escuro, e com 12 a 20 trocas de ar por hora. A temperatura e a umidade relativa foram monitoradas continuamente e gravadas duas vezes ao dia.

Dieta/Água

Uma ração padrão certificada disponível no Mercado foi dada aos animais duas vezes ao dia, com exceção da noite anterior à extração dos dentes. Comidas moles, tais como bananas foram fornecidas aos animais após a extração.

As concentrações de agentes contaminadores na dieta (ex: metais pesados, aflatoxina, organofosfatos, hidrocarbonos clorinados e bifenis policlorinados- PCBs) são controlados e constantemente medidos pelos fabricantes (o certificado do lote está arquivado no LAB Pre-Clinical Research International Inc.).

A água potável municipal (purificada por osmose reversa e tratada com luz ultravioleta) foi dada aos animais “ad libitum” à exceção de uma hora antes pelo menos da extração do dente. Análises periódicas da água potável municipal e da água que foi purificada por osmose reversa e tratada com luz ultravioleta foram realizadas pela empresa Bodycote Technitrol Inc., Pointe Claire, Quebec. Os resultados analíticos estão arquivados no LAB Pre-Clinical Research International Inc. Não foi encontrado nenhum sinal de contaminação na dieta e na água que pudesse interferir na avaliação dos objetivos deste estudo.

Aplicação do Material-Teste

Os animais foram sedados antes do tratamento (pentothal, 0.8 ml/kg), o qual foi administrado pelo Dr. Salim Nathoo. O material de isolamento foi inicialmente aplicado às gengivas para garantir proteção e foi endurecido com uma luz padrão de fotopolimerização odontológica por aproximadamente 5 segundos. Logo após, o creme protetor foi aplicado ao redor da região peribucal para proteger qualquer tecido exposto. Finalmente, o material-teste (gel clareador contendo peróxido de hidrogênio) foi aplicado topicamente por três vezes. Após cada aplicação foi direcionada uma fonte de luz, com um comprimento de onda visível, nos dentes tratados, por um período de 20 minutos. No final de cada ciclo de tratamento, o material-teste anterior era removido e uma nova camada era aplicada. As bocas de todos os animais foram enxaguadas com água purificada por osmose reversa na conclusão deste procedimento para remover qualquer material-teste residual. Os lados direitos das bocas foram tratados nos animais 1501A e 1504A; os lados esquerdos das bocas foram tratados nos animais 1502A e 1503A.

A análise do conteúdo de Peróxido de Hidrogênio do material-teste foi determinada por titulação com KMnO_4 de acordo com os procedimentos publicados na USP. Rapidamente um volume de 20ml de 2.0 N H_2SO_4 foi adicionado a uma amostra de 20ml, e esta mistura foi titulada com 0.1N KMnO_4 até que uma cor levemente cor-de-rosa permanecesse na solução após a adição de KMnO_4 . Cada ml de 0.1 N KMnO_4 equivale a 1.7005 mg H_2O_2 , e a seguinte fórmula foi usada para determinar o conteúdo de peróxido: % H_2O_2 = Peso da amostra (g)

Três amostras da substância-teste Gel de Procedimento BriteSmile Lote N°1221 foram pesadas, e o conteúdo de peróxido foi determinado como indicado acima. Uma amostra de peróxido de hidrogênio aquoso também foi analisada em duplicidade para uma comparação. Os resultados da titulação são mostrados na tabela abaixo. Todas as amostras foram analisadas em 13 de abril de 2002.

Observações Clínicas

Na transferência, um exame clínico detalhado foi feito em cada animal; observações diárias com relação a sinais clínicos foram feitas do lado de fora da jaula. No dia do tratamento, exames clínicos detalhados foram feitos antes da medicação e sinais clínicos (saúde geral, mudanças de comportamento, etc.) foram avaliados uma vez ao dia. Os pesos foram registrados na transferência, antes do tratamento no Dia 1 e no Dia 2.

Extração dos Dentes

Os 4 pré-molares superiores (2 tratados e 2 não-tratados) e 2 inferiores (1 tratado e 1 não tratado) foram extraídos de cada animal sob anestesia geral de Acepromazina e Ketamine (0,1 mL/kg) seguida de isotlurane nas 20,0 a 20,4 e 44,2 a 44,4 horas seguintes ao tratamento, respectivamente, pelo patrocinator. Um analgésico (buprenorfina, 0,3 mL/kg) foi administrado para controlar a dor após a extração e 9 a 12 horas mais tarde. Um antibiótico profilático (Pendure, 0,5 ou 1,0 mL) foi dado 22,8 a 24,5 horas antes da primeira extração e 45,0 a 46,4 horas mais tarde. Os dentes foram colocados em formalina a 10% e enviados a Biotechnics, Inc., 310 Millstone Drive, Hillsborough, NC 27278 em 12 de abril de 2002 para o exame histológico.

Procedimentos Finais

Todos os animais foram enviados à colônia reserva do LAB Pre-Clinical Research International Inc. em seguida à cessação do tratamento com antibiótico feito após a extração dos dentes.

Biotechnics, Inc. 5 CONFIDENCIAL

Descalcificação dental, Processamento, Coloração e Avaliação

Os dentes foram descalcificados em ácido fórmico / água a 10% por nove dias, e enxaguados com água, por 4 a 5 horas.

Os dentes enxaguados foram colocados em um processador automático de tecidos para

serem embutidos em parafina. As seções foram removidas da parafina e colocadas em lâminas de vidro. As lâminas foram tingidas com hematoxylina e eosina ou com tinta tricolor de Masson, e coberturas de vidro foram afixadas sobre as lâminas. As câmaras da Polpa dos dentes foram avaliadas sem conhecimento dos grupos tratados. Não foi feita nenhuma outra análise estatística dos dados além de médias e desvios padrões, devido ao tamanho reduzido da amostra.

Retenção dos Dados

Todos os dados gerados no LAB Pre-Clinical Research International Inc., juntamente com o protocolo original, o adendo do protocolo e o relatório conclusivo serão retidos por aproximadamente 10 anos nos arquivos do LAB Pre-Clinical Research International Inc. (560 Cartier Boulevard West, Laval, QC H7V 1 J 1, Canada). O LAB Pre-Clinical Research International Inc., concorda em notificar o Patrocinador com a antecedência necessária sobre qualquer intenção em disponibilizar tais materiais após os 10 anos de guarda, de modo a permitir que, o Patrocinador possa encontrar instalações alternativas seguras para a armazenagem. Os dados gerados na Biotechnics, Inc. e uma cópia do relatório final ficarão retidos pela Biotechnics, Inc. na 310 Millstone Drive, Hillsborough, NC.

Procedimentos de Operação Padrão

Os Procedimentos de Operação Padrão usados durante o curso deste estudo pelo LAB Pre-Clinical Research International Inc. e pela Biotechnics, Inc. são mantidos em arquivo nas respectivas instituições.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Mortalidade e Sinais Clínicos

Não houve mortalidade após a aplicação tópica do Material-Teste, assim como não foram observados sinais clínicos após a aplicação tópica do Material-Teste nos pré-molares (Tabela 1).

Entretanto, sinais clínicos insignificantes e associados à anestesia, tais como, uma grande quantidade de vômito e uma quantidade moderada de espuma e secreção, e um material bege foram encontrados na bandeja da jaula de uma fêmea (150 I A), aproximadamente 3 horas após a terceira aplicação do Material-Teste. Não houve nenhum efeito adverso no peso dos animais após a aplicação do Material-Teste (Tabela 2).

Extrações dos Dentes

As extrações dentais de 4 pré-molares superiores (2 tratados, 2 não-tratados) e 2 pré-molares inferiores (1 tratado, 1 não-tratado) foram feitas 20,0 a 20,4 e 44,2 a 44,4 horas, respectivamente, após o tratamento. No sistema numérico usado para dentes de seres humanos nos Estados Unidos, o Dente 1 era o anterior e corresponderia aos dentes 5 ou 12, e o dente 2 era o posterior, correspondendo aos dentes 4 e 13 neste sistema numérico. Os dentes removidos correspondem aos dentes humanos 20 ou 21 e 28 ou 29.

Avaliação Histopatológica

A dentina dos dentes de todos os animais (tratados e não-tratados) estava dentro dos limites normais um ou dois dias após o tratamento. Além disso, não houve nenhuma evidência de dano celular à polpa associado ao tratamento (Tabela 3). Vacúolos extracelulares foram observados nas polpas dos dentes tratados e não-tratados com a mesma incidência e estes são produtos de processamento idêntico. Hipoplasia epitelial foi observada em dentes não tratados de dois animais, dois dias após o clareamento.

CONCLUSÃO

Nenhuma reação adversa foi observada nos pré-molares tratados com o sistema de clareamento dental BriteSmile um ou dois dias após o tratamento.

f~~,2. ~

Data

Milton V. Marshall, Doutor, DABT

Diretor do Estudo CONFIDENCIAL Biotechnics, Inc. 6