



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL GENOTÓXICO DE GÉIS
CLAREADORES CASEIROS**

MARCÍLIO JORGE FERNANDES MONTEIRO

Manaus-AM

2017



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL GENOTÓXICO DE GÉIS CLAREADORES CASEIROS

MARCÍLIO JORGE FERNANDES MONTEIRO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal do Amazonas como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Odontologia.

ORIENTADORA: PROF. DRA. Juliana Vianna Pereira

Manaus – AM

2017

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

M742a Monetiro, Marcílio Jorge Fernandes
Avaliação do potencial genotóxico de géis de clareadores caseiros / Marcílio Jorge Fernandes Monetiro. 2017
54 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Juliana Vianna Pereira
Dissertação (Mestrado em Odontologia) - Universidade Federal do Amazonas.

1. géis clareadores. 2. genotoxicidade. 3. teste de micronúcleo. 4. tiras clareadoras. I. Pereira, Juliana Vianna II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

MARCÍLIO JORGE FERNANDES MONTEIRO

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL GENOTÓXICO DE GÉIS CLAREADORES CASEIROS

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Odontologia, do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal do Amazonas.

Manaus, de de 2017.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra Juliana Vianna Pereira, Presidente
Universidade Federal do Amazonas

Profa. Luciana Mendonça da Silva, Membro
Universidade Federal do Amazonas

Profa. Dra Carina Toda, Membro
Universidade Federal do Amazonas

De que serve ao homem conquistar o mundo inteiro se perder a alma?
Jesus Cristo

Agradecimentos

A Deus, que me ampara em todas as escolhas mostrando que sempre há um caminho para seguir.

Ao Programa de Pós Graduação em Odontologia - PPGO UFAM e a Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior- CAPES o fomento recebido para o desenvolvimento deste trabalho.

À minha orientadora, Professora Dra Juliana Vianna Pereira, por seu apoio, conhecimento compartilhado, compreensão, dedicação, sugestões e comprometimento em ensinar, pontos fundamentais para a realização deste trabalho e principalmente por servir de inspiração e me fazer persistir.

A Joane, minha namorada, responsável pelo início desta jornada, por sua paciência, compreensão, motivação e amor, amo-te.

Aos meus pais por serem à base de todas as minhas conquistas, pela confiança depositada e pelo amor incondicional.

A Ana Carla pela amizade e ajuda no curso e ao secretário Paulo pela compreensão e solicitude.

Aos colegas de mestrado, Jéssica e Diego, por toda a ajuda na construção deste trabalho.

A todos os professores de mestrado, que de alguma forma contribuíram para este trabalho.

Ao professor José Eduardo, por sua colaboração no estágio docente.

Aos familiares e amigos que sempre me incentivaram.

RESUMO

A modalidade de clareamento caseiro vem sendo bastante empregada nas últimas décadas por ser considerada mais segura para o elemento dental e apresentar comprovada eficácia clínica. O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial genotóxico do peróxido hidrogênio (PH) a 10% em pacientes submetidos ao clareamento caseiro, utilizando moldeira e dois tipos de tiras clareadoras. Os voluntários incluídos na pesquisa foram aleatoriamente divididos em: Grupo TOB - tiras clareadoras da Oral B; Grupo TUD - tiras clareadoras da Ultradent; e Grupo MPH – moldeiras. O tamanho amostral foi de 20 participantes por grupo para um estudo com poder de 80% e alfa de 5%. A avaliação foi feita através do teste de Micronúcleos, em três tempos: antes do procedimento de clareamento (D0), imediatamente após o fim do tratamento (D14) e 30 dias após o final do tratamento (D30), a partir da contagem de 1000 células. Os dados foram submetidos ao teste de normalidade Shapiro-Wilk e ao teste de Kruskal-Wallis-Dunn que expôs que não houve diferença significativa entre os grupos e entre os tempos analisados ($p=0.0109$). Concluiu-se que não houve genotoxicidade do peróxido hidrogênio (PH) a 10% em pacientes submetidos ao clareamento caseiro nas diferentes formas de aplicação testadas e nem nos tempos avaliados.

Palavras-chave: géis clareadores, genotoxicidade, teste de micronúcleo, tiras clareadoras.

ABSTRACT

At-home bleaching modality has been widely used in the last decades because it is considered safer for the dental element and has proven clinical efficacy. The aim of this study was to evaluate the genotoxic potential of 10% hydrogen peroxide (PH) in patients submitted at-home bleaching using a tray and two types of bleaching strips. The volunteers included in the study were randomly divided into: TOB Group - Oral B whitening strips; TUD Group - Ultradent whitening strips; And MPH Group - trays. The sample size was 20 participants per group for a study with 80% power and 5% alpha. The evaluation was done through the Micronucleus test, in three periods: before the bleaching procedure (D0), immediately after the end of treatment (D14) and 30 days after the end of treatment (D30), from the count of 1000 Cells. Data were submitted to the Shapiro-Wilk normality test and the Kruskal-Wallis-Dunn test that showed that there was no significant difference between the groups and between the periods analyzed ($p = 0.0109$). It was concluded that there was no genotoxicity of hydrogen peroxide (PH) to 10% in patients submitted to home bleaching in the different forms of application tested and in the periods evaluated.

Keywords: bleaching gels, genotoxicity, micronucleus test, bleaching strips.

Lista de Figuras

Figura 1	19
Coleta do esfregaço com escova citológica.	
Figura 2	20
<i>Aplicação do Etanol a 80% para Fixação do esfregaço.</i>	
Figura 3	21
Aplicação da solução de Giemsa com auxílio de pipeta de Pasteur.	
Figura 4	22
Imagem de microscopia óptica de células com micronúcleos.	
Figura 5	29
Fluxograma do ensaio clínico.	

Lista de Tabelas

Tabela 1	18
Distribuição dos grupos experimentais.	
Tabela 2	29
Características demográficas dos grupos experimentais.	
Tabela 3	30
Frequência de micronúcleos por 1000 células contadas.	

Sumário

1. Introdução	11
2. Objetivos	15
3. Materiais e método	16
4. Capítulo 1	24
5. Conclusão	34
6. Referências	35
7. Apêndice 1	39
8. Apêndice 2	41
9. Anexo 1	43
10. Anexo 2	48

1. INTRODUÇÃO

O aspecto desfavorável provocado pela alteração de cor dos dentes reflete uma crescente demanda da odontologia estética (KIHN., 2007). Neste contexto, há uma valorização de procedimentos menos invasivos. Destacam-se como opção as técnicas de clareamento, como alternativas conservadoras para a recuperação da estética dos dentes (LOGUERCIO et al., 2002).

Existem procedimentos realizados em consultório pelo profissional com uso de peróxido de hidrogênio ou peróxido de carbamida em altas concentrações e os métodos de clareamento caseiro, realizados pelo próprio paciente com recomendações feitas pelo dentista, contendo concentrações mais baixas dessas substâncias. (GERLACH., 2000). Estas vêm sendo bastante empregadas nas últimas décadas, por serem consideradas mais seguras para o elemento dental e apresentar comprovada eficácia clínica (SULIEMAN., 2008). O emprego de sua técnica baseia-se no uso de um gel, o qual é aplicado na face vestibular dos dentes, através do uso de moldeiras individualizadas (HAYWOOD e HEYMANN., 2006; SULIEMAN., 2008).

Na atualidade, novos sistemas de clareamento caseiro têm sido utilizados, sendo comercializados em diferentes formas de apresentação. Neste sentido, as tiras clareadoras têm sido amplamente empregadas devido à facilidade de utilização e obtenção. Esses materiais são à base de poliestireno flexível, no qual uma concentração pré-determinada (5,3 a 14%) de peróxido de hidrogênio é uniformemente aplicada na superfície aderente, diretamente sobre o esmalte da face vestibular (HASSON, ISMAIL e NEIVA, 2006; SWIFT et al., 2009).

Entretanto, preocupações foram levantadas sobre a segurança do uso de peróxido de hidrogênio para clareamento dental, em relação a uma possível genotoxicidade e carcinogenicidade (NAIK, TREDWIN e SCULLY., 2006). Em uma revisão crítica sobre os aspectos biológicos do clareamento dental feita por Dahal e Pallesen (2003), a partir de estudos disponíveis na literatura sobre o assunto, houve o consenso sobre a indução de efeitos genotóxicos em bactérias e células cultivadas a partir do contato direto com peróxido de hidrogênio. Por outro lado, vários estudos *in vivo* avaliando a formação de micronúcleos após a exposição a esses agentes, não revelaram o mesmo efeito. O peróxido de hidrogênio tem fraco potencial carcinogênico de indução local, mas seu efeito genotóxico não é claro, uma vez que sua toxicidade, decorrente da formação de radicais livres, pode danificar estruturas intracelulares e atacar o DNA (DAHL e PALLESEN; 2003; RIBEIRO, MARQUES e SALVATORI., 2005; KLARIC et al., 2013).

Dentre os métodos citogenéticos para avaliação de genotoxicidade nas células epiteliais destaca-se o teste de micronúcleos. A técnica é minimamente invasiva e tem sido utilizada como um biomarcador da exposição de vários agentes genotóxicos e sua correlação com o risco de câncer (BANSAL et al., 2012; NADERI, FARHADI e SARSHAR., 2012; KLARIC et al., 2013; DE GEUS, et al., 2015).

Os micronúcleos são estruturas que medem de 1/3 a 1/5 do tamanho do núcleo (SCHMID., 1975). Originam-se a partir de fragmentos de cromossomos totais ou parte de fragmentos de cromossomos acêntricos que se “perdem” na anáfase durante a divisão celular (IARMARCOVAI et al., 2008), não sendo incluídos no núcleo das células filhas na telófase (BELIEN, et al., 1995; MATEUCA et al., 2006). Por haver uma potencial chance de erros de classificação segundo Tolbert et al (1992), os mesmos estabeleceram critérios para a identificação e contagem de

micronúcleos a partir de um estudo de teste realizado previamente. Segundo os autores, é necessário que as células apresentem as seguintes características: citoplasma intacto e relativamente plano; pouca ou nenhuma sobreposição com células adjacentes; pouco ou nenhum detrito; e núcleo normal e intacto, com perímetro nuclear normal e distinto. E os parâmetros para a identificação de micronúcleos: arredondado com perímetro liso sugestivo de uma membrana; menos de um terço do diâmetro do núcleo associado, mas suficientemente grande para discernir forma e cor; intensidade de coloração semelhante ao núcleo; textura similar ao núcleo; mesmo plano focal do núcleo; ausência de sobreposição com o núcleo; e não ter pontes com o núcleo principal.

O teste de micronúcleos é simples e rápido, as células podem ser obtidas facilmente, sem necessidade de cultivo. O processamento e coloração é menos demorado em comparação a outros sistemas de teste, podendo ser realizado em laboratórios com equipamento básico. As células podem ser fixadas e armazenadas por um longo período de tempo. No entanto, diferentes protocolos podem ser a razão para a discrepância de resultados do teste. A maioria dos grupos de pesquisa avaliam em torno de 1000 a 2000 células por paciente (MAJER et al., 2001., BOLOGNESI et al., 2015). A frequência normal de micronucleos em células mucosas é entre 0,5 a 2,0/1000 células (NERSEYAN et al 2011, NADERI et al 2012).

Apesar da extensiva investigação dos efeitos de agentes clareadores sobre os dentes (ATTIN et al., 2009), a genotoxicidade dessas substâncias, principalmente das tiras clareadoras, permanece pouco conhecida em humanos (MINOUX e SERFATY., 2008) devido à carência de trabalhos nesse campo e com as poucas evidências que estão atualmente disponíveis. Portanto, considerando que

abordagens celulares são utilizadas frequentemente para identificar etiologias para os problemas de saúde (AU., 2007), o objetivo do presente estudo foi avaliar a genotoxicidade do peróxido hidrogênio (PH) a 10% em pacientes submetidos ao clareamento caseiro, utilizando moldeira e dois tipos de tiras clareadoras.

2. OBJETIVOS

Objetivo geral:

Avaliar o potencial genotóxico do peróxido hidrogênio (PH) a 10% em pacientes submetidos ao clareamento caseiro, utilizando moldeira e dois tipos de tiras clareadoras.

Objetivos específicos:

Avaliar o potencial genotóxico dos agentes clareadores à base de PH a 10% nas diferentes formas de aplicação através da frequência de micronúcleos no tecido gengival;

Comparar o potencial genotóxico das diferentes formas de aplicação do PH a 10% nos pacientes submetidos ao clareamento dental, antes e após o clareamento, nos períodos de 0, 14, 30 dias.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Princípios éticos.

A pesquisa está situada no âmbito do projeto “Avaliação da sensibilidade e genotoxicidade causadas em adolescentes submetidos ao clareamento com tiras ou moldeiras,” que foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal do Amazonas- UFAM (CAAE 46945715.6.0000.5020). É um ensaio clínico controlado, randomizado, duplo-cego, estruturado com base nas normas do CONSORT (Consolidated Standards of Reporting Trials). O recrutamento dos participantes da pesquisa ocorreu por meio de anúncios publicitários locais (jornais, estações de rádio e *site* da Universidade). Os responsáveis assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Apêndice 1), e os voluntários assinaram Termo de Assentimento (Apêndice 2), os quais informavam as particularidades inerentes à participação na pesquisa, assim como sobre o desenvolvimento da mesma e a possibilidade de desistência da pesquisa a qualquer momento.

Critérios de inclusão e exclusão.

Foram incluídos pacientes de ambos os sexos, com idade entre 15 e 20 anos, sem doenças sistêmicas (metabólicas, cardiopatias e imunológicas), e condição bucal sem lesões cáries e sem doenças periodontais, que apresentaram pelo menos um incisivo central ou canino com cor A2 ou mais escura e os seis dentes anteriores superiores livres de restaurações na face vestibular, esmalte hígido, insatisfação com a cor de seus dentes e sem alterações patológicas, fisiológicas e medicamentosas.

Foram excluídos do estudo paciente com hipersensibilidade, tabagistas, etilistas, grávidas ou lactantes, com aparelho ortodôntico, apinhamento severo e presença de manchas intrínsecas.

Desenho do Estudo.

É um ensaio clínico controlado, randomizado, duplo-cego, estruturado com base nas normas do CONSORT (Consolidated Standards of Reporting Trials).

Cálculo do tamanho da amostra.

O cálculo para determinar o tamanho da amostra do estudo se baseou na frequência de micronúcleo por 1000 células. Em um estudo da literatura (GEUS, et al., 2015) observou-se que a frequência normal de micronúcleo em pacientes saudáveis é de aproximadamente $1 \pm 1,1$. Para que o procedimento clareador seja considerado seguro, espera-se não encontrar uma diferença de média superior a um. Desta forma é necessário um tamanho amostral mínimo de 20 participantes para um estudo com poder de 80% e alfa de 5%. O tamanho da amostra foi calculado utilizando o website www.sealedenvelope.com.

Aleatorização e Grupos Experimentais

Os voluntários incluídos na pesquisa foram aleatoriamente divididos em três grupos (Tabela 1), a saber: **TOB** (tiras clareadoras com peróxido de hidrogênio a 10% da Oral B®), **TUD** (tiras clareadoras com peróxido de hidrogênio a 10% da Ultradent®) e **MPH** (moldeiras com peróxido de hidrogênio a 10% White class FGM). A aleatorização foi realizada no site *SealedEnvelope software* e os números foram colocados em envelopes lacrados e opacos até o momento do procedimento. Estes foram preparados por um membro não envolvido em nenhuma das fases do ensaio

clínico. O operador não tinha conhecimento do tipo de clareamento que o paciente ia receber até o momento do início do atendimento.

Nos grupos TOB e TUD, os pacientes foram instruídos a usar as tiras clareadoras com peróxido de hidrogênio a 10% durante 30 minutos, aplicados duas vezes ao dia, por 14 dias.

No grupo MPH foi confeccionada a moldeira de clareamento a partir da moldagem com alginato dos arcos superior e inferior dos pacientes. Os moldes obtidos foram vazados com gesso para obtenção dos modelos. Foram utilizadas placas de acetato de 1 mm para a confecção das moldeiras de clareamento. Não foi realizado nenhum alívio da face vestibular das moldeiras. Os excessos de material das placas foram cortados a 1 mm da margem gengival das faces vestibular e lingual ou palatina. A adaptação das moldeiras foi observada em cada paciente e os ajustes necessários foram realizados (CARDOSO *et al.*, 2010). As seringas com peróxido de hidrogênio a 10% e moldeiras individualizadas foram entregues para os pacientes, que foram instruídos a usar o gel clareador por 30 minutos, duas vezes ao dia, durante, por 14 dias.

Antes de cada sessão de 30 minutos, todos os pacientes (grupos TOB, TUD e MPH) foram orientados a escovarem os dentes normalmente com pasta de dentes sem agentes dessensibilizantes. Nenhum agente dessensibilizante foi entregue aos pacientes.

Tabela 1- Distribuição dos grupos experimentais.

Grupos	Gel clareador	Concentração	Tempo de exposição	Frequência	Duração
TOB	Oral B	10%	30 min.	2x ao dia	14 dias
TUD	Ultradent	10%	30 min.	2x ao dia	14 dias
MPH	White class FGM	10%	30 min.	2x ao dia	14 dias

Avaliação da genotoxicidade por frequência de micronúcleos.

Coleta e fixação do esfregaço.

A técnica de citologia esfoliativa (GEUS et al., 2015 modificada) foi realizada em três momentos: antes do procedimento de clareamento (D0), imediatamente após o fim do tratamento (D14) e 30 dias após o final do tratamento (D30).

Primeiramente, o paciente foi orientado a realizar bochecho com água durante 1 minuto. Em seguida, uma escova citológica foi friccionada firmemente na gengiva da região de canino a canino, com pouca pressão para não causar lesões ao tecido gengival (Figura 1).



Figura 1- Coleta do esfregaço com escova citológica

Imediatamente após, o esfregaço foi distribuído sobre uma lâmina de vidro, que foi secada com um jato de ar da seringa tríplice, por um período de 1 minuto a uma distância aproximada de 30 cm para evitar excessiva desidratação das células. Os esfregaços foram fixados em 80% de metanol (Figura 2) por um minuto e as lâminas foram novamente secadas. Para cada tempo foram coletadas duas lâminas de cada paciente.

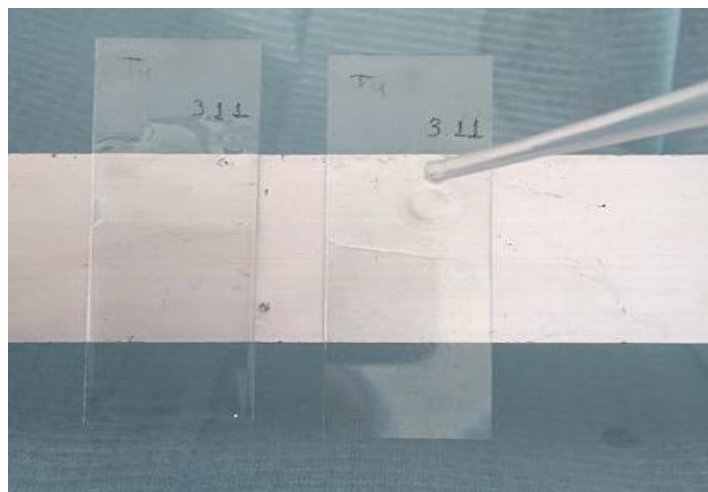


Figura 2- Aplicação do Etanol a 80% para Fixação do esfregaço

Procedimentos de coloração

O protocolo de coloração foi preparado imediatamente após a coleta do esfregaço (Quadro 1). Cinco a seis gotas de solução de Giemsa em estoque (7,6 g/L; Glicerol: 500 mL/L; Metanol: 500 mL/L; Newprov®), foram aplicadas diretamente sobre a lâmina por 2 minutos com auxílio de uma pipeta Pasteur. Em seguida as lâminas foram lavadas em dois recipientes com água (recipiente 1= 3 a 4 mergulhos, recipiente 2= 2 a 3 mergulhos). Após esse processo, as lâminas foram secadas por um minuto, conforme descrito anteriormente. Em seguida, 3 gotas de adesivo Entellan foram aplicadas sobre o esfregaço visivelmente seco para posicionamento da lamínula de vidro (Figura 3).



Figura 3- Aplicação da solução de Giemsa com auxílio de pipeta de Pasteur

SEQUÊNCIA	AÇÃO	PROCEDIMENTO
1	Coleta do esfregaço	Realizada no tecido com escova citológica e distribuída sobre a lâmina.
2	Secagem	Realizada com seringa tríplice por 1 min. A uma distância de 30 cm.
3	Fixação	Com 80% de metanol por 1min.
4	Secagem	Realizada com seringa tríplice por 1 min. A uma distância de 30 cm.
5	Coloração	Cinco a seis gotas de solução de Giemsa em estoque (7,6 g/L; Glicerol: 500 mL/L; Metanol: 500 mL/L; Newprov®), por 2 min.
6	Lavagem	Recipiente 1= 3 a 4 mergulhos, recipiente 2= 2 a 3 mergulhos.
7	Secagem	Realizada com seringa tríplice por 1 min. A uma distância de 30 cm.
8	Montagem da lamínula	3 gotas de adesivo Entellan aplicadas sobre o esfregaço visivelmente seco.

Quadro 1- Protocolo de preparação das lâminas.

Avaliação das lâminas/ contagem de micronúcleo.

O examinador foi treinado e calibrado previamente (Kappa intra-examinador 0,855).

A contagem das células foi realizada sob um microscópio óptico Coleman®, com 100x de magnificação e quando os micronúcleos foram encontrados, a magnificação foi aumentada para 400x. Para cada período (D0, D14 e D30), de cada paciente foram contadas 1000 células (Figura 4).

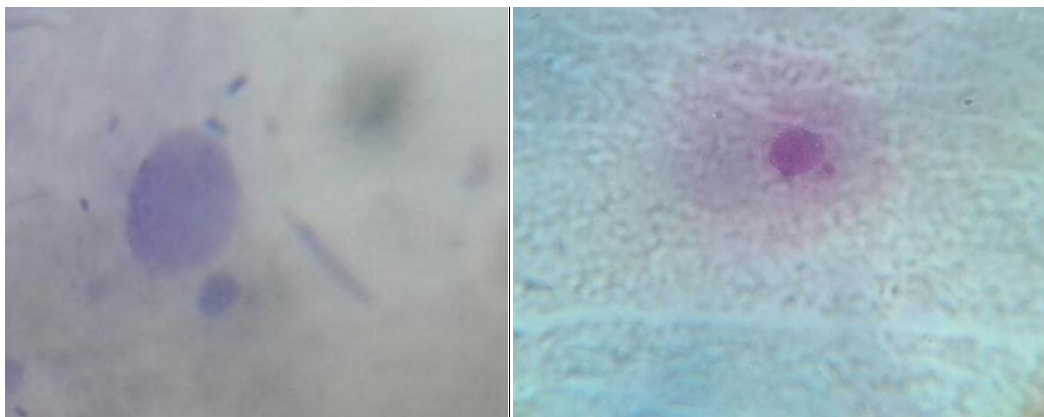


Figura 4- Imagem de microscopia óptica, 100x, de células com micronúcleos.

Os critérios para inclusão na contagem total de células foram os seguintes (Tolbert et al 1992):

- 1) citoplasma intacto e que se encontra relativamente plano;
- 2) pouca ou nenhuma sobreposição com as células adjacentes;
- 3) pouco ou nenhum detrito/ sujeira;
- 4) núcleo normal e intacto, com perímetro nuclear normal e distinto.

Os parâmetros para a identificação de micronúcleos foram os seguintes:

- 1) arredondado com perímetro liso sugestivo de uma membrana;
- 2) menos de um terço do diâmetro do núcleo associado, mas suficientemente grande para discernir forma e cor;

- 3) intensidade de coloração semelhante ao núcleo;
- 4) textura similar ao núcleo;
- 5) mesmo plano focal do núcleo;
- 6) ausência de sobreposição com o núcleo;
- 7) não ter pontes com o núcleo principal.

Morte ou degeneração celular (cariólise, cariorrexe, fragmentação nuclear) foram excluídas da avaliação.

Análise estatística

Os dados originais foram tabulados utilizando o programa Excel (Microsoft corporation, EUA) e foram submetidos ao teste Shapiro Wilk de normalidade (H_0 descartada = não normal em todas as colunas) e ao teste de o teste de Kruskal-Wallis. A análise estatística foi realizada comparando os resultados entre as técnicas e entre os três tempos avaliados.

4. CAPÍTULO 1

ARTIGO I

A Revista escolhida para submeter o artigo é a **Clinical Oral Investigations**, com Fator de Impacto 2.207 e **QUALIS A2**.

Capa

Autores:

Marcílio Jorge Fernandes Monteiro

Juliana Vianna Pereira

Jéssica Bruna Corrêa Lindoso

Nikeila Chacon de Oliveira Conde

Diego dos Santos Cordeiro

Emilio Carlos Sponchiado Junior

Alessandro Dourado Loguércio

Título: avaliação do potencial genotóxico de tiras clareadoras: estudo clínico randomizado duplo cego.

Filiação dos Autores:

Marcílio Jorge Fernandes Monteiro – Estudante de pós-graduação, Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Brasil. Tel. (55-92) 99251-5703; e-mail: marcilio.fernandes@hotmail.com

Juliana Vianna Pereira – Professora de Estomatologia, Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Brasil. Tel. (55-92) 08121-1347 e-mail: juvpereira@hotmail.com

Jéssica Bruna Corrêa Lindoso – Estudante de pós-graduação, Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Brasil. Tel. (55-92) 99364-8555; e-mail: jesse_bruna@hotmail.com

Nikeila Chacon de Oliveira Conde – Professora de Estomatologia, Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Brasil. Tel. (55-92) 98111-1772; e-mail: nikeilaconde@ufam.edu.br

Diego dos Santos Cordeiro – Estudante de pós-graduação, Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Brasil. Tel. (55-92) 99153-1358; email: diego.scordeiro@hotmail.com

Emilio Carlos Sponchiado Junior- Professor de Endodontia, Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Brasil. Tel. (55-92) 08121-1347; e-mail: spemilio@me.com

Alessandro Dourado Loguércio – Professor de Dentística Restauradora da Faculdade Estadual de Ponta Grossa, Paraná, Brasil. Tel (55-42) 32203741;

Resumo

Objetivo O objetivo deste estudo clínico randomizado foi avaliar o potencial genotóxico do peróxido hidrogênio (PH) a 10% em pacientes submetidos ao clareamento caseiro, utilizando moldeira e dois tipos de tiras clareadoras.

Materiais e métodos Os 60 voluntários incluídos no estudo foram aleatoriamente divididos em: Grupo TOB - tiras clareadoras da Oral B; Grupo TUD - tiras clareadoras da Ultradent; e Grupo MPH – moldeiras. A avaliação foi feita através do teste de Micronúcleos, em três tempos: antes do procedimento de clareamento (D0), imediatamente após o fim do tratamento (D14) e 30 dias após o final do tratamento (D30), a partir da contagem de 1000 células de cada tempo.

Resultado A contagem de micronúcleos não indicou potencial genotóxico em nenhum dos grupos estudados, independente dos tempos analisados (p= 0.0109).

Conclusão Não houve genotoxicidade do peróxido hidrogênio (PH) a 10% em pacientes submetidos ao clareamento caseiro nas diferentes formas de aplicação testadas e nem nos tempos avaliados.

Relevância Clínica Os resultados encontrados neste ensaio clínico direcionam para a segurança do uso de géis clareadores caseiros à base de peróxido de hidrogênio em baixa concentração, entretanto novos ensaios são necessários para respaldar a segurança destes produtos.

Palavras-chave: géis clareadores, genotoxicidade, teste de micronúcleo, tiras clareadoras.

Introdução

O aspecto desfavorável provocado pela alteração de cor dos dentes reflete uma crescente demanda da odontologia estética [1]. Neste contexto, há uma valorização de procedimentos menos invasivos. Destacam-se como opção, as técnicas de clareamento como alternativas conservadoras para a recuperação da estética dos dentes [2].

Os métodos de clareamento caseiro, com uso de peróxido de hidrogênio, vêm sendo bastante empregados nas últimas décadas, por serem considerados mais seguros para o elemento dental, devido à baixa concentração, e por apresentarem comprovada eficácia clínica [3].

Dentro destes métodos, encontram-se as tiras clareadoras que têm sido amplamente empregadas devido à facilidade de utilização. Esses materiais são à base de um poliestireno flexível, no qual uma concentração pré-determinada (5,3 a 14%) de peróxido de hidrogênio é uniformemente aplicada na superfície aderente, diretamente sobre o esmalte da face vestibular dos dentes [4, 5].

Entretanto, preocupações foram levantadas sobre a segurança do uso de peróxido de hidrogênio para clareamento dental, em relação a uma possível carcinogenicidade [6]. Em uma revisão crítica sobre os aspectos biológicos do clareamento dental [7], houve o consenso sobre a indução de efeitos genotóxicos em bactérias e células cultivadas a partir do contato direto com peróxido de hidrogênio. Por outro lado, vários estudos *in vivo* avaliando a formação de micronúcleos após a exposição a esses agentes, não revelaram o mesmo efeito. O peróxido de hidrogênio tem fraco potencial carcinogênico de indução local, mas seu efeito genotóxico não é claro, uma vez que sua toxicidade, decorrente da formação de radicais livres, pode danificar estruturas intracelulares e atacar o DNA [7–9].

Dentre os métodos citogenéticos para avaliação de genotoxicidade nas células epiteliais destaca-se o teste de micronúcleos. A técnica é minimamente invasiva, simples e rápida. O micronúcleo é uma estrutura que mede de 1/3 a 1/5 do tamanho do núcleo [10], origina-se a partir de fragmentos de cromossomos totais ou parte de fragmentos de cromossomos acêntricos que se “perdem” na anáfase durante a divisão celular [11], não sendo incluídos no núcleo das células filhas na telófase [12, 13]. Esta estrutura é utilizada como um biomarcador da exposição de vários agentes genotóxicos possibilitando correlação com o risco de câncer [9, 14–16].

A frequência normal de micronúcleos em células mucosas é entre 0,5 a 2,0/1000 células (NERSEYAN et al 2011, NADERI et al 2012). Entretanto, a idade influencia na eficiência fisiológica. [17]. Assim, os possíveis danos no material genético que são observados podem ocorrer não apenas em consequência da exposição a agentes genotóxicos, como também de reações químicas relacionadas a processos fisiológicos [21], variação que pode ser evitada em ensaios clínicos que avaliam pacientes jovens.

Apesar de haver extensiva investigação dos efeitos de agentes clareadores sobre os dentes [22], é difícil avalia-los no tecido mole para definir sua significância clínica [9], principalmente das tiras clareadoras, devido acarência de trabalhos nesse campo e com as poucas evidências que estão atualmente disponíveis. Portanto, o objetivo do deste trabalho foi avaliar a genotoxicidade do peróxido hidrogênio (PH) a 10% em pacientes submetidos ao clareamento caseiro, utilizando moldeira e dois tipos de tiras clareadoras.

Material e métodos

A pesquisa foi submetida e aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal do Amazonas- UFAM (CAAE 46945715.6.0000.5020) e registrado no Registro Brasileiro de Clínica Trials-REBEC (000000000). É um ensaio clínico controlado, randomizado, duplo-cego, estruturado com base nas normas do CONSORT (Consolidated Standards of Reporting Trials). O recrutamento dos participantes da pesquisa ocorreu por meio de anúncios publicitários locais (jornais, estações de rádio e *site* da Universidade). Os responsáveis assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), e os voluntários assinaram Termo de Assentimento.

A amostra foi composta por pacientes de ambos os sexos, com idade entre 15 e 20 anos, sem doenças sistêmicas (metabólicas, cardiopatias e imunológicas), e condição bucal sem lesão cariiosa e sem doenças periodontais, livres de restaurações na face vestibular, esmalte hígido, insatisfação com a cor de seus dentes e sem alterações patológicas, fisiológicas e medicamentosas. Não puderam participar do estudo pacientes com hipersensibilidade, tabagista, etilista, grávida ou lactente.

O cálculo para determinar o tamanho da amostra do estudo se baseou na frequência de micronúcleo por 1000 células. Em um estudo da literatura [16]. Observou-se que a frequência normal de micronúcleo em pacientes saudáveis é de aproximadamente $1 \pm 1,1$. Para que o procedimento clareador seja considerado seguro, espera-se não encontrar uma diferença de média superior a um. Desta forma é necessário um tamanho amostral mínimo de 20 participantes para um estudo com poder de 80% e alfa de 5%. O tamanho da amostra foi calculado utilizando o web site www.sealedenvelope.com.

Os voluntários incluídos na pesquisa foram aleatoriamente divididos em três grupos, a saber: TOB (tiras clareadoras com peróxido de hidrogênio a 10% da Oral B®), TUD (tiras clareadoras com peróxido de hidrogênio a 10% da Ultradent®) e MPH (moldeiras com peróxido de hidrogênio a 10% White class FGM). A aleatorização foi realizada no *Sealed Envelop software* e os números foram colocados em envelopes lacrados e opacos até o momento do procedimento. Estes foram preparados por um membro não envolvido em nenhuma das fases do ensaio clínico. Os examinadores não tinham conhecimento do tratamento que o paciente ia receber.

Foram selecionados, através dos critérios de inclusão e exclusão, 66 indivíduos de um total de 300 avaliados. No decorrer da execução do projeto houve perda de pacientes em todos os grupos. O fluxograma do estudo é mostrado na Figura 1.

Intervenção do Estudo

Nos grupos TOB e TUD, os pacientes foram instruídos a usar as tiras clareadoras com peróxido de hidrogênio a 10% duas vezes ao dia, durante 30 minutos, por 14 dias.

No grupo MPH foi confeccionada moldeira de clareamento a partir da moldagem com alginato dos arcos superior e inferior dos pacientes. Os moldes obtidos foram vazados com gesso para confecção de modelos de estudo. Foram utilizadas placas de acetato de 1 mm para a confecção das moldeiras de clareamento. Não foi realizado nenhum alívio da face vestibular das moldeiras. Os excessos de material das placas foram cortados a 1 mm da margem gengival das faces vestibular e lingual ou palatina. A adaptação das moldeiras foi observada em cada paciente e os ajustes necessários foram realizados [23]. As seringas com peróxido de hidrogênio a 10% e moldeiras individualizadas foram entregues para os pacientes, que foram instruídos a usar o gel clareador duas vezes ao dia, durante 30 minutos, por 14 dias.

Procedimentos de coleta, fixação e coloração do esfregaço.

A técnica de citologia esfoliativa foi realizada três vezes, primeiramente antes do procedimento de clareamento (D0), imediatamente após o fim do tratamento (D14) e 30 dias após o final do tratamento (D30). A coleta foi realizada com escova citológica, que foi friccionada firmemente, com pouca pressão para não causar lesões ao tecido gengival. Imediatamente após, o esfregaço foi distribuído sobre uma lâmina de vidro, que foi secada com um jato de ar da seringa tríplice, por um período de 1 minuto a uma distância aproximada de 30 cm para evitar excessiva desidratação das células. Os esfregaços foram fixados em 80% de metanol por um minuto e as lâminas serão novamente secadas.

O protocolo de coloração foi preparado imediatamente após a coleta do esfregaço. Cinco a seis gotas de solução de Giemsa em estoque (7,6 g/L; Glicerol: 500 mL/L; Metanol: 500 mL/L; Newprov®), foram aplicadas diretamente sobre a lâmina por 2 minutos com auxílio de uma pipeta Pasteur. Em seguida as lâminas foram lavadas em dois recipientes com água (recipiente 1= 3 a 4 mergulhos, recipiente 2= 2 a 3 mergulhos). Após esse processo, as lâminas foram secadas por um minuto, conforme descrito anteriormente. Em seguida, 3 gotas de adesivo Entellan foram aplicadas sobre o esfregaço visivelmente seco para posicionamento da lamínula de vidro.

Avaliação das lâminas/ contagem de micronúcleo.

A contagem das células foi realizada por um examinador treinado e calibrado previamente (Kappa intra-examinador 0,855), sob um microscópio óptico Coleman®, com 100x de magnificação, e quando os micronúcleos foram encontrados, a magnificação foi aumentada para 400x. Para cada período (D0, D14 e D30), de cada paciente foram contadas 1000 células.

Os critérios para inclusão na contagem total de células foram os seguintes [24]:

- 1) citoplasma intacto e que se encontra relativamente plano;
- 2) pouca ou nenhuma sobreposição com as células adjacentes;
- 3) pouco ou nenhum detrito/ sujeira;
- 4) núcleo normal e intacto, com perímetro nuclear normal e distinto.

Os parâmetros para a identificação de micronúcleos serão os seguintes:

- 1) arredondado com perímetro liso sugestivo de uma membrana;
- 2) menos de um terço do diâmetro do núcleo associado, mas suficientemente grande para discernir forma e cor;
- 3) intensidade de coloração semelhante ao núcleo;
- 4) textura similar ao núcleo;
- 5) mesmo plano focal do núcleo;
- 6) ausência de sobreposição com o núcleo;
- 7) não ter pontes com o núcleo principal.

Morte ou degeneração celular (cariólise, cariorrexe, fragmentação nuclear) foram excluídas da avaliação.

Análise estatística

Os dados originais foram tabulados no utilizando o programa Excel (Microsoft corporation, EUA) e foram submetidos ao teste Shapiro de normalidade (H_0 descartada = não normal em todas as colunas) e ao teste de o teste de Kruskal-Wallis. A análise estatística foi realizada Comparando os resultados entre as técnicas e entre os três tempos avaliados.

Resultado

Foram selecionados, através dos critérios de inclusão e exclusão, 67 indivíduos de um total de 77 avaliados (Tabela 1). No decorrer da execução do projeto houve perda de pacientes em todos os grupos.

FIG. 1 Fluxograma CONSORT

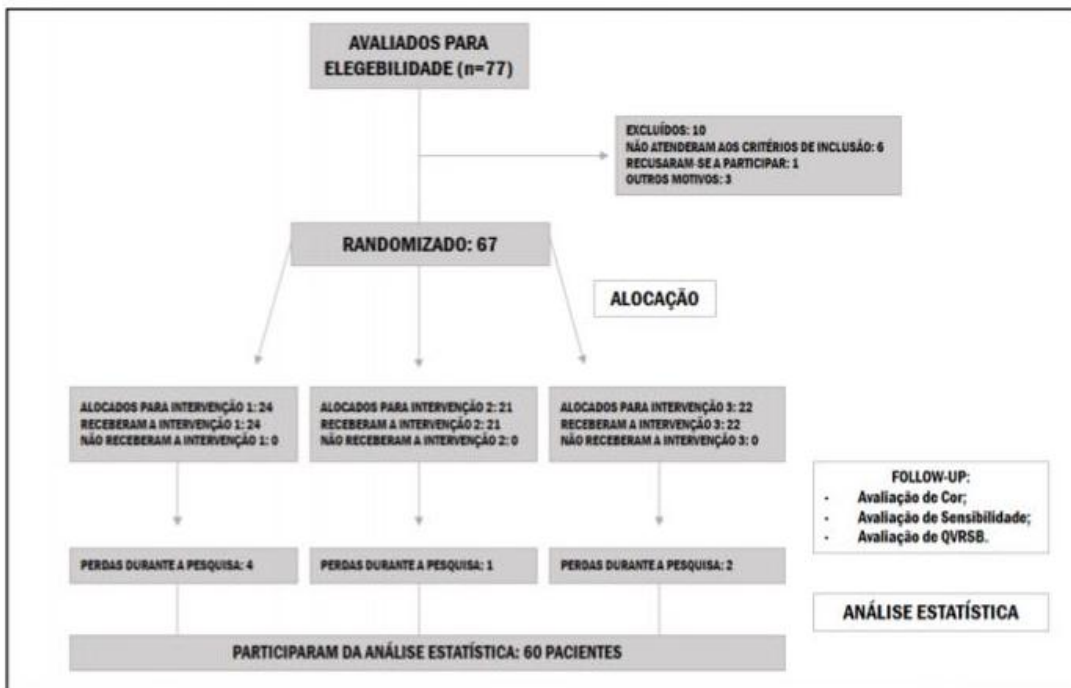


Figura 1. Diagrama representativo do fluxo de pacientes durante o estudo.

Para ensaios clínicos randomizados

Tabela 1- Características dos grupos experimentais.

	Grupo 1 TOB	Grupo 2 TUD	Grupo 3 MPH
Idade (anos; média ± *DP)	17,7 ± 1,6	17,9 ± 1,4	17,8 ± 1,4
Sexo (masculino; %)	60%	20%	40%

*DP= Desvio padrão.

Os dados foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis-Dunn que expôs que não houve diferença significativa entre os grupos e entre os tempos analisados ($p= 0.0109$), observa-se a mediana e o intervalo interquartil da frequência de micronúcleos por 1000 células esfoliadas do tecido gengival dos três grupos, em tempos diferentes (Tabela 2).

Tabela 2 Frequência de micronúcleos por 1000 células contadas.

	D0	D14	D30
	Mediana/IQR	Mediana/IQR	Mediana/IQR
Grupo 1 TOB	1/1	1/0	1/1
Grupo 2 TUD	1/0	1/1	1/1
Grupo 3 MPH	1/1	1/0	1/1

teste de Kruskal-Wallis- método de Dunn. ($p= 0.0109$)

Discussão

A preocupação com os efeitos genotóxicos do peróxido de hidrogênio não são recentes. Estudos pioneiros mostraram que o contato direto com o peróxido de hidrogênio induziu efeitos genotóxicos em bactérias e em cultura de células[7].

Entretanto, não há consenso quanto ao real efeito genotóxico dos géis clareadores. Enquanto alguns estudos sugerem que o clareamento dental a base de peróxido de hidrogênio afeta o genoma de células epiteliais, apresentando potencial genotóxico [7, 9, 25,26], outros trabalhos afirmam que nas doses e frequência que são administrados, é patente a ausência de genotoxicidade desses produtos [27, 28]. No entanto, é indubitável a escassez de ensaios clínicos que avaliam a genotoxicidade de sistemas de clareamento caseiro nas diferentes formas de apresentação.

O potencial genotóxico sugerido por muitos estudos se baseia na toxicidade do gel clareador decorrente da formação de radicais livres, incluindo o radical hidroxila, que danifica estruturas intracelulares e ataca o DNA [7–9, 25, 26]. Todavia, estes radicais tendem a ser controlados por enzimas antioxidantes, sendo, portanto, o potencial genotóxico do peróxido de hidrogênio dependente da acessibilidade dos radicais livres ao DNA alvo [7]

Além disso, a sobrecarga dos mecanismos protetores celulares seria prejudicada apenas se estes produtos fossem usados a longo prazo, em alta concentração e sem o uso de barreiras gengivais para evitar o contato do tecido mole [28, 29]. Entretanto, este ensaio clínico utilizou peróxido de hidrogênio em baixa

concentração, em moldeiras individualizadas (MPH) e em dois tipos de tiras clareadoras (TOB e TUD), por um período de 14 dias, minimizando o contato do peróxido de hidrogênio aos tecidos gengivais.

Para avaliar o possível potencial genotóxico dos produtos testados foi utilizado o teste de micronúcleos, pois a presença desta estrutura é considerada um importante biomarcador para observar danos no DNA [12, 19, 30–32]. Entretanto, as limitações desse teste são os diferentes protocolos e experimentais e pontuação critérios aplicados que podem gerar uma discrepância de resultados [24, 32, 33]. Normalmente, a coleta para a contagem de micronúcleos é realizada antes do início do tratamento e no final do mesmo [9, 16]. Neste trabalho foram realizadas em três momentos, primeiramente antes do procedimento de clareamento (D0), imediatamente após o fim do tratamento (D14) e 30 dias após o final do tratamento (D30), para que pudessem ser avaliados os eventuais efeitos residuais dos produtos utilizados.

A frequência normal de micronúcleos em células mucosas é entre 0,5 a 2,0/1000 células [15, 34]. A idade influencia na eficiência fisiológica, a literatura afirma que, com o avançar da idade, biomarcadores de danos citogenéticos, como micronúcleos (MN), têm elevadas frequências em células epiteliais esfoliadas [19,20]. Estudos sugerem que esse processo está associado a um aumento da instabilidade genômica decorrente da redução da capacidade de reparo de danos ao DNA [17,18]. Neste ensaio clínico, utilizou-se pacientes jovens, para cada período (D0, D14 e D30), foram contadas 1000 células e não foi observado potencial genotóxico, independente da técnica ou do tempo ($p= 0.0109$), concordando com os resultados de De Geus et al. [16], onde a análise de variância de dois fatores de medidas repetidas mostrou que o fator tempo ($p= 0,248$) e o tratamento ($p= 0,067$) não foram estatisticamente significantes, e Lucier et al. [28], que evidenciaram que o gel de baixa concentração não tem potencial genotóxico sobre as células do tecido gengival.

Por outro lado, o presente resultado contrasta com os outros trabalhos [25, 26], que afirmam que o gel clareador causa alterações morfológicas e produção de citocinas pró-inflamatórias que mantém o tecido em um estado cronicamente ativo, podendo predispor a célula à riscos elevados de danos, inclusive genéticos.

Apesar dos resultados seguros encontrados neste ensaio clínico, observa-se a carência de ensaios clínicos avaliando o potencial genotóxico dos novos sistemas de clareamento dental à base de peróxido de hidrogênio para respaldar a segurança destes produtos.

Conclusão

Não houve genotoxicidade do peróxido hidrogênio (PH) a 10% em pacientes submetidos ao clareamento caseiro nas diferentes formas de aplicação testadas e nem nos tempos avaliados.

Padrões éticos Todos os procedimentos realizados foram De acordo com os padrões éticos do Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo seres humanos da Universidade Federal do Amazonas.

Conflito de interesses Os autores não tem conflitos Interesse.

Termo de Consentimento Todos os responsáveis assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), e os voluntários assinaram Termo de Assentimento.

Referências Bibliográficas

1. Kihn PW (2007) Vital tooth whitening. Dent Clin North Am. 51:319–331.
2. Loguercio AD, Souza D, Floor AS et al (2002) Avaliação clínica da reabsorção radicular externa em dentes desvitalizados submetidos ao clareamento. Pesq Odontol Bras 6:131–5.

3. Sulieman MA (2008) An overview of tooth-bleaching techniques: chemistry, safety and efficacy. *Periodontol* 2000 48:148–169.
4. Hasson H, Ismail AI, Neiva G (2006) Home-based chemically-induced whitening of teeth in adults. *Cochrane Data base Syst Rev*. Doi:[10.1002/14651858.CD006202](https://doi.org/10.1002/14651858.CD006202).
5. Swift EJ, Heymann HO, Wilder AD et al (2009) Effects of duration of whitening treatment on tooth color: A randomized, placebo-controlled clinical trial *J Dent* 37:51–6.
6. Naik S, Tredwin CJ, Scully C (2006) Hydrogen peroxide tooth-whitening (bleaching): Review of safety in relation to possible carcinogenesis. *Oral Oncology* 42:668–674.
7. Dahl JE, Pallesen U (2003) Tooth Bleaching, a critical review of the biological aspects. *Version of Record* 14:292–304.
8. Ribeiro DA, Marques ME, Salvatori DM (2005) Assessment of genetic damage induced by dental bleaching agents on mouse lymphoma cells by single cell gel (comet) assay. *J of Oral Rehabilitation*. 32:766–771.
9. Klaric E, Par M, Profeta I et al (2013) Genotoxic effect of two bleaching agents on oral Mucosa. *Cancer genomics & Proteomics* 10:209–216.
10. Schmid W (1975) The micronucleus test. *Mutat res*. Feb 31:9–15.
11. Iarmarcovai S, Bonassi A, Botta RA (2008) Orsière, Genetic polymorphisms and micronucleus formation: A review of the literature, *Mutation Research* 658:215–233.
12. Belien JA, Copper MP, Braakhuis BJ et al (1995) Standardization of counting micronuclei: definition of a protocol to measure genotoxic damage in human exfoliated cells. *Carcinogenesis* 16:395–400.
13. Mateuca N, Lombaert P, Aka I et al (2006) Kirsch-Volders, Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring, *Biochimie* 88:1515–1531.
14. Bansal H, Sandhu VS, Bhandari R et al (2012) Evaluation of micronuclei in tobacco users: A study in Punjabi population *Contemporary Clinical Dentistry* 3:184–187.
15. Naderi NJ, Farhadi S, Sarshar S (2012) Micronucleus assay of buccal mucosa cells in smokers with the history of smoking less and more than 10 years. *Indian J of Pathology and Microbiology* 55:433–438.
16. De Geus JL, Bersezio C, Urrutia J et al (2015) Effectiveness and tooth sensitivity with at-home bleaching in smokers: A multicenter clinical trial. *JADA* 52:1–8.
17. Garm C, Moreno-Villanueva M, Bürkle A et al (2013) Age and gender effects on DNA strand break repair in peripheral blood mononuclear cells. *Aging Cell* 12:58–66.
18. Trzeciak AR, Barnes J, Ejiogu N et al (2008) Age, sex, and race influence single-strand break repair capacity in a human population. *Free Radic Biol Med* 45:1631–41.
19. Pinto D, Ceballos JM, García G et al (2000) Increased cytogenetic damage in outdoor painters. *Mutat Res* 467:105–11.
20. Wu PA, Loh CH, Hsieh LL et al (2004) Clastogenic effect for cigarette smoking but not areca quid chewing as measured by micronuclei in exfoliated buccal mucosal cells. *Mutat Res* 562:27–38.

21. Heuser VD, Andrade VM, Peres A et al (2008) Influence of age and sex on the spontaneous DNA damage detected by micronucleus test and comet assay in mice peripheral blood cells. *Cell Biol Int* 32:1223–9.
22. Attin T, Schmidlin PR, Wegehaupt F et al (2009) Influence of study design on the impact of bleaching agents on dental enamel micro hardness: A review *Dental Materials* 25:143–157.
23. Cardoso CP, Reis A, Loguercio A et al (2010) Clinical effectiveness and tooth sensitivity associated with different bleaching times for a 10 percent carbamide peroxide gel. *JADA* 141:1213–1220.
24. Tolbert PE, Shy CM, Allen JW (1992) Micronuclei and other nuclear anomalies in bucal smears: methods development. *Mutation Research* 271:69–77.
25. Costa Filho LC, Costa CC, Soria ML et al (2002) Effect of home bleaching and smoking on marginal gingival epithelium proliferation: A histologic study in women *J of Oral Pathology & Medicine* 31:473–480.
26. Lucier RN, Etienne O, Ferreira S et al (2013) Soft-Tissue Alterations Following Exposure to Tooth-Whitening Agents. *J Periodontol* 84:513–519.
27. Collet AM, Palmieri M, Molinari B et al (2001) Experimental study to test the potential tumor promotion effect of a tooth bleaching agent. *Acta Odontol Latinoam* 14:30–4.
28. Goldberg M, Grootveld M, Lynch E (2010) Undesirable and adverse effects of tooth-whitening products: a review. *Clin Oral Invest* 14:1–10.
29. Tredwin CJ, Naik S, Levis NJ et al (2006) Hydrogen peroxide tooth-whitening (bleaching) products: Review of adverse effects and safety issues. *British Dental J London* 200:371–376.
30. Bloching M, Hofmann AC, Lautenschla ÈA et al (2000) Exfoliative cytology of normal buccal mucosa to predict the relative risk of cancer in the upper aero digestive tract using the MN-assay. *Oral Oncology* 36:550–555.
31. **Bortoluzzi MC, Campagnoli EB, Milan JR et al (2014) Frequency of micronucleus in oral epithelial cells after exposure to mate-tea in healthy humans** *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 1:345–9.
32. Bolognesi C, Bonassi S, Knasmueller S et al (2015) Clinical application of micronucleus test in exfoliated buccal cells: A systematic review and metanalysis. *Mutation Research* 766:20–31
33. Majer BJ, Laky B, Knas S et al (2001) Use of the Micronucleus Assay with Exfoliated Epithelial Cells as a Biomarker for Monitoring Individuals at Elevated Risk of Genetic Damage and in Chemoprevention Trials. *Mutation Research, Amsterdam* 489:147–172.
34. Nersesyan AK, Kundi M, Atefie K et al (2006) Effect of staining procedures on the results of micronucleus assays with exfoliated oral mucosa cells. *Cancer Epidem Biomar* 15:1835–1840.

5. CONCLUSÃO

Não houve genotoxicidade do peróxido hidrogênio (PH) a 10% em pacientes submetidos ao clareamento caseiro nas diferentes formas de aplicação testadas e nem nos tempos avaliados.

6. REFERÊNCIAS

1. ATTIN, T.; SCHMIDLIN, P.R.; WEGEHAUPT, F.; WIEGAND, A. Influence of study design on the impact of bleaching agents on dental enamel micro hardness: A review *Dental Materials* v. 25(2) p. 143-157. 2009.
2. AU, W. Usefulness of biomarkers in population studies: From exposure to susceptibility and to prediction of cancer, *Int. J. Environ. Health* v. 210 p. 239-246, 2007.
3. BANSAL, H.; SANDHU, V.S.; BHANDARI, R.; SHARMA, D. Evaluation of micronuclei in tobacco users: A study in Punjabi population *Contemporary Clinical Dentistry* v. 3(2) p. 184-187, 2012.
4. BELIEN, J.A; COPPER M.P; BRAAKHUIS, B.J; SNOW G.B; BAAK, J.P. Standardization of counting micronuclei: definition of a protocol to measure genotoxic damage in human exfoliated cells. *Carcinogenesis*. V. 16(4), p. 395-400. 1995.
5. BOLOGNESI, C; BONASSI, S; KNASMUELLER, S; et al. Clinical application of micronucleus test in exfoliated buccal cells: A systematic review and metanalysis. *Mutation Research* v. 766; p. 20–31 2015.
6. CARDOSO, C.P.; REIS, A.; LOGUERCIO. A, VIEIRA, L.C;C, BARATIERI, L.N. Clinical effectiveness and tooth sensitivity associated with different bleaching times for a 10 percent carbamide peroxide gel. *JADA*; v. 141(10), p.1213-1220, 2010.
7. DAHL, J.E.; PALLESEN, U. Tooth Bleaching, a critical review of the biological aspects. *Version of Record*. Jul 1, v.14 (4): p.292-304 2003.
8. DE GEUS, J.L.; BERSEZIO, C.; URRUTIA, J.; YAMADA, T.; FERNÁNDEZ; E.; LOGUERCIO, A.D.; REIS, A.; KOSSATZ, S. Effectiveness and tooth

- sensitivity with at-home bleaching in smokers: A multicenter clinical trial. JADA.; v.52: p.1-8, 2015.
9. GERLACH, R.W. *Shifting paradigms in Whitening: introduction of a novel system for vital tooth bleaching*. Compend. Contin. Educ. Dent., v.21, p.S4-S9, 2000.
 10. HASSON, H.; ISMAIL, A.I.; NEIVA, G. Home-based chemically-induced whitening of teeth in adults. Cochrane Data base Syst Rev. v.18(4): CD 006202, 2006.
 11. HAYWOOD, V.B.; HEYMANN, HO. Night guard vital bleaching. Quintessence Int. v.20 (3). p. 173-176, 2006.
 12. IARMARCOVAI, S.; BONASSI, A.; BOTTA, R.A.; BANN, T. Orsière, Genetic polymorphisms and micronucleus formation: A review of the literature, Mutation Research v. 658 p.215-233, 2008.
 13. KIHN, P.W. Vital tooth whitening. Dent. Clin. North. Am. v.51 (2), p.319-331, 2007.
 14. KLARIC, E.; PAR, M.; PROFETA, I.; KOPJAR, N.; ROZGAJ, R.; KASUBA, V.; ZELJEZIC, D.; TARLE, Z. Genotoxic effect of two bleaching agentes on oral Mucosa. Cancergenomics & Proteomics v.10. p.209-216, 2013.
 15. LOGUERCIO AD, SOUZA D, FLOOR AS, MESKO M, BARBOSA NA, BUSATO ALS. Avaliação clínica da reabsorção radicular externa em dentes desvitalizados submetidos ao clareamento. Pesq Odontol Bras. v. 6, n. 2, p 131-5.2002
 16. MAJER, B. J.; LAKY, B.; KNAS MÜLLER, S.; KASSIE, F. Use of the Micronucleus Assay with Exfoliated Epithelial Cells as a Biomarker for Monitoring Individuals at Elevated Risk of Genetic Damage and in

- Chemoprevention Trials. Mutation Research, Amsterdam, v. 489, n. 2-3, p. 147-172, 2001.
- 17.MATEUCA, N; LOMBAERT, P; AKA, I; DECORDIER, M. Kirsch-Volders, Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring, Biochimie 88, p. 1515- 1531. 2006.
- 18.MINOUX, M; SERFATY, R. Vital tooth bleaching: Biologic adverse effects—A review Quintessence International. v. 39; n.8; p. 645-659. 2008.
- 19.NADERI, N.J; FARHADI, S. SARSHAR, S. Micronucleus assay of buccal mucosa cells in smokers with the history of smoking less and more than 10 years. Indian Journal of Pathology and Microbiology. v. 55; n.4 p. 433-438. 2012.
- 20.NAIK, S; TREDWIN, C.J; SCULLY, C. Hydrogen peroxide tooth-whitening (bleaching): Review of safety in relation to possible carcinogenesis. Oral Oncology. v. 42; n. 7; p. 668–674. 2006.
- 21.RIBEIRO, D.A; MARQUES, M.E.A; SALVATORI, D.M.F. Assessment of genetic damage induced by dental bleaching agents on mouse lymphoma cells by single cell gel (comet) assay. Journal of Oral Rehabilitation. v. 32 n. 10 p. 766-771. 2005.
- 22.SCHMID, W. The micronucleus test. Mutat res. Feb; v. 31; n.1; p. 9- 15. 1975.
- 23.SWIFT, E.J.; HEYMANN, H.O.; WILDER, A.D.; BARKER, M.L.; GERLACH, R.W. Effects of duration of whit endings trip treat menton tooth color: A randomized, placebo-controlledclinicaltrial. J Dent.;v.37. p. 51-6, 2009
- 24.SULIEMAN, M.A. An overview of tooth-bleaching techniques: chemistry, safety and efficacy. Periodontol 2000; v. 48: p.148-69, 2008.

25. TOLBERT P. E., SHY C. M., ALLEN J. W.; Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: methods development. *Mutation Research*; v.271, p.69-77, 1992.

7. APENDICE 1

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS

FACULDADE DE ODONTOLOGIA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Convidamos o seu(a) filho(a) para participar da Pesquisa “AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE E GENOTOXICIDADE CAUSADAS EM ADOLESCENTES SUBMETIDOS AO CLAREAMENTO COM FITAS OU MOLDEIRAS”, sob a responsabilidade do pesquisador Diego dos Santos Cordeiro, o qual pretende avaliar o grau de sensibilidade e de clareamento dos produtos clareadores em fitas e moldeiras, bem como o potencial tóxico desses produtos.

A participação é voluntária e se dará por meio da realização do tratamento clareador em sua própria casa. Será entregue um kit contendo o produto clareador, uma escova dental, um creme dental e um informativo contendo todas as informações que você precisa para realizar o tratamento e tirar suas dúvidas à respeito dos procedimentos.

O risco decorrente da participação na pesquisa é o desconforto durante o procedimento de moldagem, que pode ser sanado pela interrupção do procedimento; É possível também que ocorra um pequeno quadro de sensibilidade durante o tratamento, fato que pode ser interrompido com a paralisação do tratamento e aplicação de medidas para a redução da sensibilidade, como o uso de flúor e medicamentos com ação analgésica. Para avaliar a toxicidade, será realizada uma técnica chamada citologia esfoliativa, que é um procedimento que coleta células da camada mais superficial da gengiva, com auxílio de uma espátula metálica odontológica, sem causar feridas ou sangramentos. Todos esses procedimentos serão realizados por profissionais especializados. Se você permitir que seu filho(a) participe dessa pesquisa, estará contribuindo para o benefício da ciência e da comunidade acadêmica, resultando na evolução do tratamento nessa idade, trazendo novas informações a respeito das técnicas utilizadas, assim como os efeitos da sensibilidade e eficácia do produto, resultando em sua aplicabilidade com segurança.

Se depois de consentir a participação o Sr (a) desistir de continuar participando, tem o direito e a liberdade de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, seja antes ou depois da coleta dos dados, independente do motivo e sem nenhum prejuízo a sua pessoa. O (a) Sr (a) não terá nenhuma despesa e também não receberá nenhuma remuneração. Os resultados da pesquisa serão analisados e publicados, mas a

identidade dos participantes não será divulgada, sendo guardada em sigilo. Para qualquer outra informação, o (a) Sr (a) poderá entrar em contato com o pesquisador no endereço Av. Ayrão, 1539, Praça

14, pelo telefone (92)33054908, ou poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa – CEP/UFAM, na Rua Teresina, 495, Adrianópolis, Manaus-AM, telefone (92) 3305-5130.

Consentimento Pós-Informação:

Eu, _____, fui informado sobre o que o pesquisador quer fazer e porque precisa da minha colaboração, e entendi a explicação. Por isso, eu concordo em participar do projeto, sabendo que não vou ganhar nada e que posso sair quando quiser. Este documento é emitido em duas vias que serão ambas assinadas por mim e pelo pesquisador, ficando uma via com cada um de nós.

Assinatura do participante

Manaus, _____ de _____ de 2015.

Assinatura do Pesquisador Responsável

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS

FACULDADE DE ODONTOLOGIA

8. APÊNDICE 2

TERMO DE ASSENTIMENTO DO MENOR

Você está sendo convidado para participar da pesquisa “AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE E GENOTOXICIDADE CAUSADAS EM ADOLESCENTES SUBMETIDOS AO CLAREAMENTO COM FITAS OU MOLDEIRAS”. Seus pais permitiram que você participe.

Nessa pesquisa, queremos saber o grau de sensibilidade que você pode sentir, e o quanto o material usado para clarear seus dentes podem alterar as células que estão na sua boca.

Os jovens que irão participar dessa pesquisa têm de 15 a 20 anos de idade. Mas você não precisa participar da pesquisa se não quiser, é um direito seu, não terá nenhum problema se desistir.

A pesquisa será feita na Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Amazonas, onde os jovens receberão moldeiras com gel ou fitas clareadoras, para realizar o clareamento. Para isso, será necessário fazer um procedimento de moldagem, com um material chamado alginato. Você pode sentir um pequeno desconforto enquanto for usado esse material, mas podemos parar o procedimento quando for pedido. Para clarear os dentes, será usado Peróxido de Hidrogênio a 10%. O uso desse material é considerado seguro, mas é possível ocorrer sensibilidade, que poderá desaparecer com o uso de flúor ou medicamentos. Caso tenha alguma dúvida, você pode nos procurar pelo telefone (92) 33054908 do pesquisador Diego dos Santos Cordeiro. Mas há coisas boas que podem acontecer como os seus dentes serem clareados e conseguirmos novas informações sobre esse tratamento, para ajudarmos outros jovens.

Ninguém saberá que você está participando da pesquisa, não falaremos a outras pessoas, nem daremos a estranhos as informações que você nos der. Os resultados da pesquisa vão ser publicados, mas sem identificar os que participaram da pesquisa.

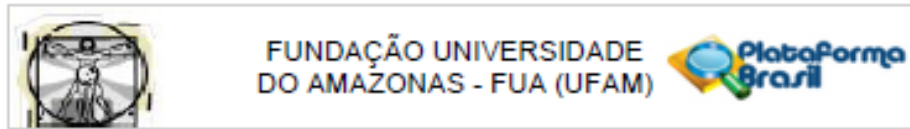
Eu, _____, aceito participar da pesquisa “AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE E GENOTOXICIDADE CAUSADAS EM ADOLESCENTES SUBMETIDOS AO CLAREAMENTO COM FITAS OU MOLDEIRAS”, que tem o objetivo de avaliar a sensibilidade e a genotoxicidade que podem ser causadas pelos agentes clareadores. Entendi as coisas ruins e as coisas boas que podem acontecer. Entendi que posso dizer “sim” e participar, mas que, a qualquer momento, posso dizer “não” e desistir. Os pesquisadores tiraram minhas dúvidas e conversaram com os meus responsáveis. Recebi uma cópia deste termo de assentimento e li e concordo em participar da pesquisa.

Manaus, ____ de _____ de 2015.

Assinatura do menor

Assinatura do Pesquisador

9. ANEXO 1



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE E GENOTOXICIDADE CAUSADAS EM ADOLESCENTES SUBMETIDOS AO CLAREAMENTO COM FITAS OU MOLDEIRAS

Pesquisador: Diego dos Santos Cordelro

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 46945715.6.0000.5020

Instituição Proponente: Faculdade de Odontologia

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

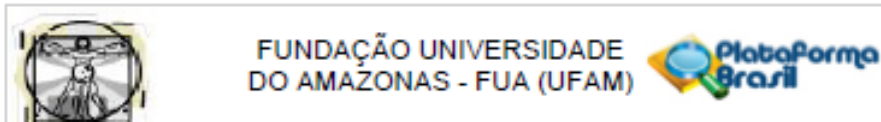
DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.310.596

Apresentação do Projeto:

mpulsionado cada vez mais por padrões de beleza inseridos na população e pelo fato de as inovações tecnológicas em materiais dentários estarem sendo alimentadas pelo desejo de pacientes jovens em melhorar a estética dos seus dentes, o tratamento clareador tornou-se popularizado e cada vez mais efetivo. Porém, devido a oferta desordenada, ausência de supervisão do profissional, interação com estruturas dentais não calcificadas, entre outros, pode causar alguns danos a esse grupo de pacientes. Assim, nos propomos a mensurar a sensibilidade que pode ser causada pelo Peróxido de Hidrogênio a 10% em suas diferentes formas de apresentação, bem como sua efetividade e potencial genotóxico em pacientes jovens. Serão utilizados 60 pacientes, com faixa etária de 15 a 20 anos, distribuídos em três grupos. Os grupos 1 e 2 receberão o tratamento clareador por meio de fitas branqueadoras da Oral B® e Ultradent®, respectivamente. O grupo 3 receberá o tratamento clareador caseiro, com moldelras individuais. Para a avaliação da sensibilidade, os participantes serão instruídos a recordar a percepção de dor diariamente durante o clareamento através da Escala Numérica de 5 pontos (NRS) e da Escala Visual Analógica (VAS). A avaliação da cor será realizada antes do estudo T1, T1.1= 7 dias após o início do tratamento, no final do protocolo de clareamento T2=14 dias, T3= após 1 semana após o término, T4= 1 mês após o término meses, T5= 3 meses após o término e T6= 6 meses após o

Endereço: Rua Teresina, 4950
 Bairro: Adleópolis CEP: 69.057-070
 UF: AM Município: MANAUS
 Telefone: (92)3305-5130 Fax: (92)3305-5130 E-mail: cep@ufem.edu.br



Continuação do Parecer: 1.310.596

término, com escala Vita Clássica, escala Vita Bleach e espectrofotômetro Easyshade (Easyshade®, Vivadent, Brea, CA, USA). A genotoxicidade será avaliada por meio de avaliação de frequência de micronúcleos, através da técnica de citologia esfoliativa nos períodos T0, T1 e T2. Os dados obtidos submetidos ao teste de normalidade pelo programa GraphPad (La Jolla, CA, EUA) e dependendo dos resultados serão aplicados os testes paramétricos ou não paramétricos. Os pacientes submetidos ao tratamento clareador responderão aos questionários de avaliação de QVRSB em três momentos: no início do estudo (baseline), ou seja, antes de serem submetidos ao tratamento clareador; após uma semana do término do tratamento clareador; e 30 dias após o término do tratamento clareador. Esta pesquisa destaca-se pelo estudo dos agentes clareadores em uma população pouco estudada, pois a maioria dos estudos envolvem populações adultas, sendo que cada vez mais, jovens e adolescentes tem acesso facilitado aos produtos clareadores.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Avaliar a sensibilidade e genotoxicidade do peróxido de hidrogênio (PH) a 10% em adolescentes submetidos ao clareamento caseiro utilizando tiras clareadoras e moldelas.

Objetivo Secundário:

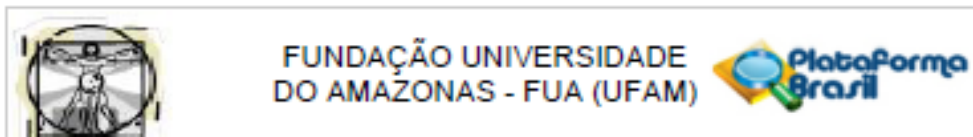
- Avaliar o grau de sensibilidade dos agentes clareadores à base de PH a 10% nas diferentes formas de aplicação;
- Comparar a efetividade das diferentes formas de aplicação do PH a 10% nos pacientes submetidos ao clareamento dental nos períodos de 0, 7 dias, 14 dias, 1 mês, 3 e 6 meses.
- Avaliar o potencial genotóxico dos agentes clareadores à base de PH a 10% nas diferentes formas de aplicação através da frequência de micronúcleos no tecido gengival;
- Comparar a genotoxicidade das diferentes formas de aplicação do PH a 10% nos pacientes submetidos ao clareamento dental, antes e após o clareamento, nos períodos de 0, 14, 30 dias.
- Avaliar a influência do uso de agentes clareadores na qualidade de vida relacionada à saúde bucal (QVRSB) em pacientes submetidos ao clareamento dentário.

avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Os procedimentos para a execução dos tratamentos clareadores propostos nesse estudo consistem em um procedimento de moldagem, realizado sob as normas de biossegurança, e aplicação de gel clareador de baixa concentração e com comprovada evidência científica, com instruções explícitas e detalhadas para cada forma de apresentação. Os procedimentos de moldagem podem resultar no desconforto do paciente, que pode ser sanado pela interrupção do

Endereço: Rua Teresina, 4950
 Bairro: Adrianópolis CEP: 69.057-070
 UF: AM Município: MANAUS
 Telefone: (92)3305-5130 Fax: (92)3305-5130 E-mail: cep@ufam.edu.br



Continuação do Parecer: 1.310.596

ato, e em algum tipo de contaminação. Porém, ressalta-se que essa contaminação apenas é possível quando esses procedimentos não são realizados respeitando as normas de biossegurança. É possível também que ocorra um pequeno quadro de sensibilidade durante o tratamento, fato que pode ser interrompido com a paralisação do tratamento e aplicação de medidas para a redução da sensibilidade, como o uso de fluoretos e medicação analgésica. A citologia esfoliativa é um procedimento não invasivo que coleta células da camada superficial do epitélio bucal, com auxílio de uma espátula metálica odontológica, sem causar lesões ou sangramentos. Evidenciando a execução da segurança dos procedimentos experimentais, profissionais especializados na área realizarão todas as etapas. Os riscos da aplicação dos questionários de QVRSB se relacionam à possibilidade de identificação dos indivíduos e suas percepções subjetivas. Assim como para todos os parâmetros clínicos, os dados subjetivos também serão resguardados quanto à garantia de sua confidencialidade. Desta forma os resultados serão expressos em termos de médias e proporções para o conjunto dos indivíduos, resguardando-se a confidencialidade dos dados individualizados.

Benefícios:

Por fim, esse ensaio clínico beneficia a ciência e a comunidade acadêmica, resultando na evolução do tratamento nessa faixa etária, trazendo novas informações a respeito das técnicas utilizadas, assim como os efeitos da sensibilidade e eficácia do produto, resultando em sua aplicabilidade com segurança, além da possibilidade de identificação da terapia com melhor impacto positivo na qualidade de vida dos indivíduos submetidos ao clareamento.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A presente pesquisa é uma Dissertação de Mestrado do Mestrando Diego dos Santos Cordeiro sob a orientação da Prof. Maria Fulgência Costa Lima Bandeira, do Programa de Pós-graduação em Odontologia da UFAM.

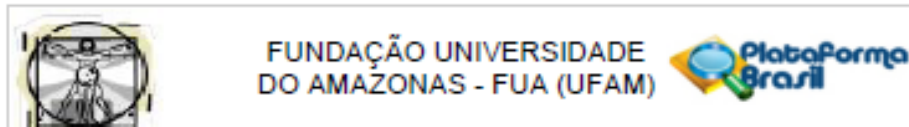
A pesquisa foi aprovada em 16 de julho de 2015. O pesquisador responsável deu entrada em uma emenda para acrescentar um objetivo específico no projeto original.

Está sendo proposto a inclusão da avaliação da qualidade de vida relacionada à saúde bucal em pacientes que se submeteram ao clareamento dental, a ser avaliado QVRSB. Para avaliação do desfecho de QVRSB serão utilizados três instrumentos: Oral Health Impact Questionnaire -14 (OHIP-14), Oral Health Impact Questionnaire-Esthetic e o Oral Impact In Daily Performances (OIDP) em três momentos.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Quanto à emenda proposta, o pesquisador apresentou todas as alterações necessárias, inclusões

Endereço: Rua Teresina, 4950			
Bairro: Adrianópolis		CEP: 69.057-070	
UF: AM	Município: MANAUS		
Telefone: (92)3305-5130	Fax: (92)3305-5130	E-mail: cep@ufam.edu.br	



Continuação do Parecer: 1.310.596

do item nos riscos e benefícios da pesquisa, apresentou os Instrumentos de coleta, estes já reconhecidos na literatura, ajuste do TCLE e do cronograma.

Recomendações:
não se aplica.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Considerando que a emenda propõe a Inclusão de mais uma análise (qualidade de vida), a qual não interferiu nos parâmetros éticos, sendo apresentado todos os itens obrigatórios de forma clara e satisfatória, considera-se a emenda dentro das exigências éticas.

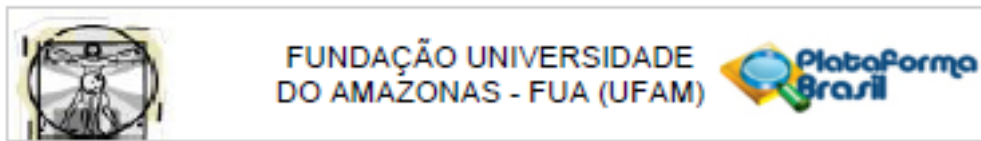
Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_556252 ET.pdf	06/10/2015 18:16:28		Acelto
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_CEP_Diego_Cordeiro.docx	06/10/2015 17:58:12	Diego dos Santos Cordeiro	Acelto
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Termo_de_Assentimento_do_Menor.docx	06/10/2015 17:57:10	Diego dos Santos Cordeiro	Acelto
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Responsavel.docx	06/10/2015 17:56:12	Diego dos Santos Cordeiro	Acelto
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.docx	06/10/2015 17:54:10	Diego dos Santos Cordeiro	Acelto
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_499120.pdf	25/06/2015 21:41:59		Acelto
Outros	Termo de Anuência.pdf	24/06/2015 13:12:05		Acelto
Folha de Rosto	Folh de Rosto.pdf	24/06/2015 13:06:31		Acelto

Situação do Parecer:
Aprovado

Endereço: Rua Teresina, 4950	CEP: 69.057-070
Bairro: Adrianópolis	
UF: AM	Município: MANAUS
Telefone: (92)3305-5130	Fax: (92)3305-5130 E-mail: cep@ufam.edu.br



Continuação do Parecer: 1.310.596

Necessita Apreciação da CONEP:
Não


MANAUS, 05 de Novembro de 2015

Assinado por:
Ellana Maria Pereira da Fonseca
(Coordenador)

Endereço: Rua Teresina, 4950
Bairro: Adriópolis CEP: 69.057-070
UF: AM Município: MANAUS
Telefone: (02)3305-5130 Fax: (02)3305-5130 E-mail: cep@ufam.edu.br


10.ANEXO 2

03/02/2017 **Clinical Oral Investigations –incl. option to publish open access**
 Medicine - Dentistry | Clinical Oral Investigations – incl. option to publish open access

 www.springer.com


Dentistry Home > Medicine > Dentistry

SUBDISCIPLINES JOURNALS BOOKS SERIES TEXTBOOKS REFERENCE WORKS



Clinical Oral Investigations

Editor-in-Chief: Matthias Hennig
 ISSN: 1432-6961 (print version)
 ISSN: 1436-3771 (electronic version)
 Journal no. 754



\$99.00 Personal Rate e-only for the Americas
[Get Subscription](#)

Online subscription, valid from January through December of current calendar year
 Immediate access to this year's issues via SpringerLink
 1 Volume(-s) with 9 issue(-s) per annual subscription
 Automatic annual renewal
 More information: >> [FAQs](#) // >> [Policy](#)

[ABOUT THIS JOURNAL](#) [EDITORIAL BOARD](#) [SOCIETIES](#) [ETHICS & DISCLOSURES](#)
[INSTRUCTIONS FOR AUTHORS](#)

Instructions for Authors

TYPES OF PAPERS

Papers may be submitted for the following sections:

- Original articles
- Invited reviews
- Short communications
- Letters to the editor

It is the general policy of this journal not to accept case reports and pilot studies.

EDITORIAL PROCEDURE

If you have any questions please contact:

Prof. Dr. G. Schmalz
 University of Regensburg
 Department of Conservative Dentistry and Periodontology
 Franz-Josef-Strauß-Allee 11
 93053 Regensburg
 Germany
 e-mail: gottfried.schmalz@klinik.uni-regensburg.de

http://www.springer.com/medicine/dentistry/journal/754?print_view=true&dataPage=ptci_1000598 1/16

000072017

Clinical Oral Investigations –incl. option to publish open access

Tel.: +49 941 9446024,

Fax: +49 941 9446025

MANUSCRIPT SUBMISSION**Manuscript Submission**

Submission of a manuscript implies: that the work described has not been published before; that it is not under consideration for publication anywhere else; that its publication has been approved by all co-authors, if any, as well as by the responsible authorities – tacitly or explicitly – at the institute where the work has been carried out. The publisher will not be held legally responsible should there be any claims for compensation.

Permissions

Authors wishing to include figures, tables, or text passages that have already been published elsewhere are required to obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format and to include evidence that such permission has been granted when submitting their papers. Any material received without such evidence will be assumed to originate from the authors.

Online Submission

Please follow the hyperlink "Submit online" on the right and upload all of your manuscript files following the instructions given on the screen.

Further Useful Information

please follow the link below

Further Useful Information

The Springer Author Academy is a set of comprehensive online training pages mainly geared towards first-time authors. At this point, more than 50 pages offer advice to authors on how to write and publish a journal article.

Springer Author Academy**TITLE PAGE**

The title page should include:

- The name(s) of the author(s)
- A concise and informative title
- The affiliation(s) and address(es) of the author(s)
- The e-mail address, telephone and fax numbers of the corresponding author

Abstract

Please provide a structured abstract of 150 to 250 words which should be divided into the following sections:

- ▷ Objectives (stating the main purposes and research question)
- ▷ Materials and Methods
- ▷ Results
- ▷ Conclusions
- ▷ Clinical Relevance

These headings must appear in the abstract.

Keywords

Please provide 4 to 6 keywords which can be used for indexing purposes.

TEXT

Text Formatting

Manuscripts should be submitted in Word.

- ▷ Use a normal, plain font (e.g., 10-point Times Roman) for text.
- ▷ Use italics for emphasis.
- ▷ Use the automatic page numbering function to number the pages.
- ▷ Do not use field functions.
- ▷ Use tab stops or other commands for indents, not the space bar.
- ▷ Use the table function, not spreadsheets, to make tables.
- ▷ Use the equation editor or MathType for equations.
- ▷ Save your file in docx format (Word 2007 or higher) or doc format (older Word versions).

Manuscripts with mathematical content can also be submitted in LaTeX.

LaTeX macro package (zip, 182 kB)

Headings

Please use no more than three levels of displayed headings.

Abbreviations

Abbreviations should be defined at first mention and used consistently thereafter.

Footnotes

Footnotes can be used to give additional information, which may include the citation of a reference included in the reference list. They should not consist solely of a reference citation, and they should never include the bibliographic details of a reference. They should also not contain any figures or tables.

Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data). Footnotes to the title or the authors of the article are not given reference symbols.

Always use footnotes instead of endnotes.

Acknowledgments

Acknowledgments of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section on the title page. The names of funding organizations should be written in full.

REFERENCES

Citation

Reference citations in the text should be identified by numbers in square brackets. Some examples:

1. Negotiation research spans many disciplines [3].
2. This result was later contradicted by Becker and Seligman [5].
3. This effect has been widely studied [1-3, 7].

Reference list

The list of references should only include works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication. Personal communications and unpublished works

00000017

Clinical Oral Investigations – incl. option to publish open access

should only be mentioned in the text. Do not use footnotes or endnotes as a substitute for a reference list.

The entries in the list should be numbered consecutively.

▷ **Journal article**

Gamelin FX, Baquet G, Berthoin S, Thevenet D, Nourry C, Nottin S, Bosquet L (2009) Effect of high intensity intermittent training on heart rate variability in prepubescent children. *Eur J Appl Physiol* 105:731-738. doi: 10.1007/s00421-008-0955-8

Ideally, the names of all authors should be provided, but the usage of "et al" in long author lists will also be accepted:

Smith J, Jones M Jr, Houghton L et al (1999) Future of health insurance. *N Engl J Med* 341:325–329

▷ **Article by DOI**

Sitka MK, Whiton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. *J Mol Med*. doi:10.1007/s001090000086

▷ **Book**

South J, Blass B (2001) *The future of modern genomics*. Blackwell, London

▷ **Book chapter**

Brown B, Aaron M (2001) The politics of nature. In: Smith J (ed) *The rise of modern genomics*, 3rd edn. Wiley, New York, pp 230-257

▷ **Online document**

Carlwright J (2007) Big stars have weather too. *IOP Publishing PhysicsWeb*. <http://physicsweb.org/articles/news/11/6/16/1>. Accessed 26 June 2007

▷ **Dissertation**

Trent JW (1975) *Experimental acute renal failure*. Dissertation, University of California

Always use the standard abbreviation of a journal's name according to the ISSN List of Title Word Abbreviations, see

[ISSN.org LTWA](http://www.issn.org/LTWA)

If you are unsure, please use the full journal title.

For authors using EndNote, Springer provides an output style that supports the formatting of in-text citations and reference list.

[EndNote style \(zip, 2 kB\)](#)

Authors preparing their manuscript in LaTeX can use the bibltx file `spbasic.bst` which is included in Springer's LaTeX macro package.

TABLES

- ▷ All tables are to be numbered using Arabic numerals.
- ▷ Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.
- ▷ For each table, please supply a table caption (title) explaining the components of the table.
- ▷ Identify any previously published material by giving the original source in the form of a reference at the end of the table caption.
- ▷ Footnotes to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data) and included beneath the table body.

0002/2017

Clinical Oral Investigations – incl. option to publish open access

For each supplementary material, please supply a concise caption describing the content of the file.

Processing of supplementary files

Electronic supplementary material will be published as received from the author without any conversion, editing, or reformatting.

Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your supplementary files, please make sure that

The manuscript contains a descriptive caption for each supplementary material
Video files do not contain anything that flashes more than three times per second (so that users prone to seizures caused by such effects are not put at risk)

ENGLISH LANGUAGE EDITING

For editors and reviewers to accurately assess the work presented in your manuscript you need to ensure the English language is of sufficient quality to be understood. If you need help with writing in English you should consider:

- Asking a colleague who is a native English speaker to review your manuscript for clarity.
- Visiting the English language tutorial which covers the common mistakes when writing in English.
- Using a professional language editing service where editors will improve the English to ensure that your meaning is clear and identify problems that require your review. Two such services are provided by our affiliates Nature Research Editing Service and American Journal Experts.

English language tutorial
Nature Research Editing Service
American Journal Experts

Please note that the use of a language editing service is not a requirement for publication in this journal and does not imply or guarantee that the article will be selected for peer review or accepted.

If your manuscript is accepted it will be checked by our copyeditors for spelling and formal style before publication.

•

为便于编辑和评审专家准确评估您稿件中陈述的研究工作，您需要确保您的英语语言质量足以令人理解。如果您需要英文写作方面的帮助，您可以考虑：

- 请一位以英语为母语的同事审核您的稿件是否表意清晰。
- 查看一些有关英语写作中常见语言错误的教程。
- 使用专业语言编辑服务，编辑人员会对英语进行润色，以确保您的意思表达清晰，并识别需要您复核的问题。我们的附属机构 Nature Research Editing Service 和合作伙伴 American Journal Experts 即可提供此类服务。

教程
Nature Research Editing Service
American Journal Experts

